





CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853



第32卷 第1期 Vol.32 No.1
2011年2月

《灵长类动物与人类疾病模型》专刊



中国科学院昆明动物研究所 中国动物学会 主办
科学出版社 出版

ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.32, No.1 Feb., 2011

CONTENTS

Special Issue for Primates and Animal Models of Human Diseases

Guest Editors: *XU Lin, ZHENG Yong-Tang*

Zoological Research Websites: http://www.zoores.ac.cn; http://www.kiz.ac.cn; http://www.wanfangdata.com.cn; http://dwxy.chinajournal.net.cn; http://www.ceps.com.tw; http://www.bioline.org.br/

《灵长类动物与人类疾病模型》专刊

主编寄语

在中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室各位学科带头人的倡导和组织下,在昆明医学院、中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所、昆明理工大学、广西肿瘤防治研究所和广东省昆虫研究所等多家单位同行的大力支持下，经过近 5 个月的稿件征集、专家会审和单独审稿、编校等工作，2011 年《动物学研究》第 32 卷第 1 期——《灵长类动物与人类疾病模型》专刊终于与读者见面了。

本期专刊刊发的评述（代序）1 篇、研究论文 9 篇、研究报告 1 篇、评述和综述 6 篇等都涉及灵长类动物（猕猴、食蟹猴、熊猴、野生和人工驯养树鼩等）的基础生物学、分子生物学/遗传学、生物化学、神经生物学、血液学、生理学、流行病及免疫学等学科领域。这些文章提供了灵长类动物与人类疾病模型研究所需的一些关键基础数据，集中体现了这些领域的新思想和新成果，具有较高的学术质量或较强的实用性。本期的 6 篇评述和综述，从最基本的概念到该领域的发展、存在问题等都作了精辟的分析和阐述；对非人灵长类的肿瘤、糖尿病和乙/丙型肝炎动物模型及其对精神疾病研究作用等作了全面、详细的概述，还就中国树鼩实验动物化的成就和经验进行了总结，也为今后的科学研究抛砖引玉。为此，我作为主编谨向为本专刊做出贡献的所有作者、审者和编者致以诚挚的谢意！

今年是“十二五”开局之年，本专刊的出版，对中国科学院昆明动物研究所推进中国科学院“创新 2020”方案的实施，并按中国科学院要求，以解决关系国家全局和长远发展的基础性、战略性、前瞻性的重大科技问题为着力点，重点突破带动技术革命，促进产业振兴的前沿科学问题，以及突破提高人民群众健康水平、保障改善民生以及生态和环境保护等重大公益性科技问题，无疑是一个良好的开端，也是为体现创新集群的集体智慧做了一次有益的尝试。

此外，在国内期刊如林的今天，专刊的出版也为本刊探索提高期刊质量和进一步扩大影响搭建了一个崭新的平台。我希望有更多的科学家来做本刊的 Guest Editor，使本刊能更好地为创新集群服务，为国家需求服务，办出特色、办出风格、办出水平，让作者放心，让读者满意，越办越好！

《动物学研究》主编

院士

2011 年 2 月 8 日

中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室介　绍

一、发展历程

中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室（以下简称重点实验室）的前身是所级重点实验室，成立于2005年12月20日，是研究所三大中长期发展领域之一，被中国科学院列入三期创新工程重点建设候选项目，以填补我国在该领域技术平台的空白。在实验室全体成员的共同努力下，历经多年的建设和发展，实验室在抗艾滋病和抗抑郁症新药药效学评价关键技术、疾病灵长类动物模型、生物毒素结构与功能、疾病遗传学等研究方面取得了显著成果，形成了鲜明的特色。2007年9月，经向中国科学院提出申请，通过院计划财务局组织的专家组的严格现场评审，于2008年12月19日正式批准成立“中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室”。此外，经向云南省科技厅提出申请，并通过一年多的培育建设和发展，于2010年7月19日顺利通过云南省科技厅组织的专家组验收，正式成为“云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室”。

二、研究方向与目标

围绕天然活性物质的结构与功能、重大人类疾病的灵长类动物模型创建和天然活性物质药效学评价，重点实验室目前的研究方向主要集中在以下三个方面：

1. 天然活性多肽与蛋白质研究关键技术和资源库；
2. 人类疾病的灵长类动物模型；
3. 重大疾病机理研究与新药研发关键技术。

最终目标是促进学科交叉，形成我国特色的以动物模型为基础，以解析重大人类疾病发病机理、发现新药物作用靶点和创制新药为导向的创新药物研发的网络体系和平台，促进我国生物医学基础研究和医药产业的发展，满足我国人口与健康领域的重大需求。

三、研究队伍

重点实验室现有14个学科组，固定职工88人，其中博士36人，硕士18人，学士25人。平均年龄36.1岁，形成了包括3名国家杰出青年基金获得者、9名中科院“百人计划”入选者和2名云南省“高端科技人才”入选者的一支年富力强、励精图治的团队，渐已成为吸引、凝聚国内外优秀人才的重要基地。2010年，通过中科院“百人计划”和“引进海外高层次人才”等方式，重点实验室先

后从美国引进4位博士，其中2位为美国副教授，有力地扩展和充实了实验室的体量和结构。

四、支撑条件

实验室自2005年组建以来，一直以昆明动物研究所实验动物中心为依托，以国家、科学院和发改委正式批准和支持建设的中国科学院昆明灵长类研究中心、国家昆明高等级生物安全灵长类实验中心、昆明国家生物产业基地实验动物中心和中国科学院昆明生物多样性大型仪器区域中心为基础，推动和加快实验室支撑体系的建设和发展。其中，昆明动物研究所实验动物中心是中国科学院1982年规划布局确定的科学院三大实验动物基地之一，中心现有猕猴、平顶猴、短尾猴、熊猴、食蟹猴、金丝猴和树鼩等11个种三千多头实验灵长类动物种群。国家昆明高等级生物安全灵长类实验中心可容纳500头灵长类动物实验，同时满足12个新药的筛选及药效学实验。2010年，“树鼩饲养繁殖基地”已正式启动扩展，规划同时饲养5000只树鼩，预计2011年4月完工，届时将实现树鼩普通群、封闭群和近交系饲养繁殖一体化综合基地的功能，为研究体系提供全面支撑，并有望取得产业化方面的突破。

五、近五年重要成果

1. 申请项目情况

近五年来，重点实验室主持或参与包括“973”、 “863”、国家“重大新药创制”科技重大专项、国家自然科学基金重点项目、国家杰出青年基金、云南省高端科技人才引进计划等国家、省(部) 科研任务共118项，共争取到合同经费17498万元。承担国家重大科研任务55项，总合同经费13967万元。

2. 专利、论文、获奖等情况

近五年来，重点实验室共获得发明专利29项，其中1项为国际授权专利；17个新药品种已经进入临床前，5个新药进入临床，3个新药品种上市，协议转让新药新技术成果2800万元；获国家自然科学二等奖1项，云南省科学技术奖励一等奖3项，二等奖2项；发表揭示人类重大疾病机理和药物作用靶点的SCI论文250余篇。

3. 疾病机理解析与动物模型创制

重点实验室团队利用多学科交叉技术手段，发现一系列重要的疾病机理和药物作用新靶点：发现创伤后应激综合征的单氨类调控机理，揭示辣椒素和糖皮质激素受体在抑郁症和毒品成瘾过程中的新机制；发现视神经萎缩发病的线粒体遗

传机制，为该病的诊治和预防提供了新的方向；阐明了限制因子 TRIM5α对抗HIV-1 的分子机制；发现 CD176 可作为恶性肿瘤生物治疗的新靶标。在动物模型研究方面，创制了我国特有的艾滋病猕猴模型；完善了抑郁症啮齿类模型，并在此基础上创制了树鼩的抑郁症模型；创制了特有的树鼩 HCV 肝损伤模型；建立了猕猴巴金森氏病模型和新型小鼠老年痴呆模型。

4. 药效评价和技术平台

重点实验室已在“天然药物活性物质与功能”领域取得了突出的成果，建立了系统完善的以灵长类动物模型为基础的新药筛选评价体系，形成了鲜明的特色，在相关领域处于不可或缺的地位。建立并完善了多肽、蛋白质药物分子资源库，目前已筛选了天然活性物质 4000 余种；建立了国内最完整从分子、细胞到动物模型的抗艾滋病药物药效学评价平台，筛选和研究了 5000 多种化合物的抗 HIV 活性，发现了一系列具有抗 HIV-1 活性的化合物，完成了 11 个抗 HIV 新药的临床前药效学评价，其中 2 个抗 HIV 新药获得 SFDA 的药物临床研究批件，是我国抗 HIV 药物研究的最主要基地之一；建立了从递质、受体到抑郁症动物模型各层面的体内外筛选和研究抗抑郁症药物的技术和方法，完成天然 1 类抗抑郁新药“奥生乐赛特”的临床前研究，并通过国家药监局专家评审答辩会，正在等待临床实验批文；建立了非人灵长类转基因动物平台，成功获得世界上第三例（我国首例）转基因动物。

王　霜

（中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，中国科学院昆明动物研究所，　云南　昆明　650223）

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 1−3
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01001

人类疾病的动物模型



徐 林*

(中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所， 云南 昆明 6500223)

摘要：发展对人类疾病有效的预测、预防、诊断和治疗等途径, 一直是人口健康领域关注的焦点。任何人类疾病似乎都可归咎于遗传背景和环境因素的共同作用，并影响到疾病的发生、病程、药物疗效和预后等。最有效的研究策略是直接针对患者的各方面临床研究, 但这一策略常常会面临着同一临床症状却有不同病因 (异质性)、个体差异显著 (如治疗效果因人而异) 以及难以回溯性地研究人类疾病的发生、发展 (如发病以前的事件或经历) 等问题, 而且医学伦理学的要求使得大量医学研究和新药新疗法不能直接应用于人体, 必须先有动物实验阐明其安全性和必要性。最佳的研究策略是创建人类疾病的动物模型, 因为可严格地控制病因、遗传背景、环境因子等, 也可跟踪性研究动物模型病症的发生、发展、治疗反应和结局等, 但这一策略也常常面临着一系列问题和误解。对此,在《动物学研究》出版《灵长类动物与人类疾病模型》专刊之际, 撰写此评述性论文, 将系列问题和误解一一提出, 并讨论其应对策略。

关键词：动物模型; 人类疾病; 非人灵长类; 新药开发
中图分类号：R-332; Q959.848; R954 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0001-03

Animal models of human diseases

XU Lin*

（*Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Kunming Yunnan* 650223*, China*）

Abstract: The development of efficient ways to predict, prevent, diagnose and treat human diseases is of great interest to human society and is a focus of life science research. It is widely believed that all human diseases may be attributed to the interaction between genetic and environmental risk factors, and this interaction influences the genesis, course, drug response and outcome of the diseases. The most effective approach for research into human diseases is the clinical study, but this can be hampered by disease heterogeneity, marked individual differences and the difficulty in tracking the history and course of a disease. Additionally, no study should be performed on humans without preclinical assessments in non-human animals. The best strategy for research into human diseases is to use animal models that mimic the genesis, course, drug response and outcomes of human disease and where the etiology, genetic background and environmental factors can be strictly controlled, unfeasible in clinical studies of humans. However, there are many problems associated with the study of animal models for human disease, some of which are based on misunderstanding. For this special issue of *Zoological Research* we discuss these problems and misunderstandings.

Key words: Human diseases; Animal models; Nonhuman primates; Drug development

1 模式动物与动物模型

模式动物, 是指除人类以外的动物物种, 广泛应用于疾病或生物学研究, 例如线虫广泛应用于发育、衰老等遗传学和代谢学的研究; 果蝇广泛应用于发育的基因调控、学习和记忆、基因功能发现等研究; 小鼠广泛应用于基因操作和功能研究; 比格犬广泛应用于药物长期毒性评价等。这些动物就是相应研究目标的模式动物, 最终目的可应用于人类疾病的预测、预防、诊断和治疗等。截然不同的是, 动物模型, 是指除人类以外的活体动物实验, 广泛

收稿日期：2010-12-06; 接受日期：2010-12-24
基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-EW-R-12）和中国科学院基础前沿研究专项项目（KSCX2-EW-J-23）资助
*通讯作者 (Corresponding author) 暨第一作者简介：都柏林大学三一学院药理治疗系博士、百人计划和 NSFC 杰出青年基金获得者。现任中国科学院昆明动物研究所学术委员会、动物模型与人类疾病机理重点实验室主任，中国神经科学学会基础与临床精神病学分会副主任委员。长期从事疾病动物模型与神经可塑性研究及新药研发，参与化学药物一类新药抗老年痴呆症酚克络酮的筛选、药效评价、负责天然药物一类新药抗抑郁症奥生乐赛特的筛选、药效评价。

应用于疾病或生物学研究。简单来说, 就是用模式动物建立动物模型, 例如抑郁症的大鼠模型, 就是指利用模式动物大鼠, 建立动物模型研究抑郁症。

2 人类疾病与动物模型

抑郁症是一种人类疾病，表现为人类大脑情绪功能持续低下。抑郁症的动物模型是指用活体动物实验研究抑郁症，不等价于人类疾病。从系统进化的角度看, 大鼠也有情绪功能及其相应的细胞分子机制，研究大鼠的情绪功能揭示人类抑郁症是完全可行的。实际上人类疾病的动物模型具有严格的定义。理想的动物模型至少需要满足三个一致性验证：与人类疾病具有相似的发病机理 (疾病同源性)、与人类疾病具有相似的行为表象(表象一致性)、与人类疾病具有相似的药物治疗反应 (药物预见性)。目前啮齿类 (大鼠、小鼠) 被广泛应用于建立人类疾病的动物模型包括抑郁症动物模型; 但是啮齿类与人类之间存在极大的种属差异, 致使人类疾病的动物模型很难同时满足上述三个一致性条件。最典型的例子发生在生物医药领域, 活体动物实验证明 1 万个活性物质, 最终仅有 1 个物质能通过临床试验成为新药, 其他活性物质因成药性差、临床无效或毒性等被淘汰。因此，建立人类疾病的动物模型需要新的策略。

3 新药研发的核心问题—— 成药性

用大鼠建立人类疾病的动物模型, 以发现活性物质的有效性剂量范围；用大鼠和比格犬进行药物安全评价, 以发现活性物质的毒性剂量范围; 用有效性和毒性剂量之间的窗口, 以判断活性物质的成药性, 已经成为生物医药领域的惯例。 但是新药研发的成功率仍然仅有万分之一。新药临床试验无效仅涉及风险投入失败, 经济损失相对较小; 而新药临床试验出现致死毒性, 历史上已经使得一些医药企业付出巨额的经济赔偿而破产。其最根本原因在于大鼠和比格犬与人类之间存在巨大的种属差异。

为了避免出现临床无效和致死毒性, 并且提高新药研发的成功率, 绝大多数医药企业采用的策略是开发已有临床药物的类似结构新药(“me too” or “me better” drugs)或类似作用机理新药(similar mechanism of action, SMOA drugs)。几十年来的事实表明, 这种策略使新药研发的成功率提高, 但是许多如此的新药并不能产生更佳的临床疗效, 而且许多临床药物的缺点也被这些新药继续保留，因而对疾病的治疗并没有实质性改善。

实际上许多有实力的医药企业已经采取了更好的策略, 就是利用非人灵长类动物建立人类疾病的动物模型来评价活性物质的有效剂量范围; 利用非人灵长类动物进行药物安全评价。这给创新药物研发仅带来了一线生机, 其原因是非人灵长类动物资源已经非常匮乏, 动物保护、动物伦理、昂贵的实验费用和难以忍受的实验周期等因素限制了这一策略的推广。

4 创制人类疾病的猴模型和树鼩模型的必要性

无论各种成本有多昂贵, 针对一些人类重大疾病仍然只能利用非人灵长类动物建立动物模型, 这些疾病包括艾滋病、老年痴呆症等。其原因是一方面艾滋病、老年痴呆症的猴模型能更好地模拟人类疾病;另一方面用其他动物很难建立此模型, 例如 HIV 仅感染部分灵长类和人类。此外，相对于人类来说, 正常大鼠的工作记忆能力已经非常低下，类似于人类痴呆症,它们完全不能完成 Wisconsin 延缓反应工作记忆任务, 显然用大鼠建立老年痴呆症具有严重缺陷。发展这些重大疾病的猴模型就具有不可替代性, 有很好的前景应用于发现有效的预测、预防、诊断和治疗等新途径。

然而, 人类疾病的猴模型也存在类似于人类疾病的临床研究问题。几十年来众多的灵长类种类的饲养繁殖并没有能够建立遗传背景可控的品系, 猴本身的各种生理指标和疾病也不够清楚, 因而人类疾病的猴模型研究中个体差异显著问题无法克服, 跟踪性研究猴模型病症的发生、发展、治疗反应和结局等也因周期漫长而受到极大限制。另外, 基于猴的基因操作相对于小鼠和果蝇来说, 还处于起步阶段, 通过定点、定时表达外源基因和基因敲除来研究基因功能和分子机理还有很长一段路要走。正因为如此, 猴模型研究特别需要国家层面的长期地、稳定地大力支持。

也许作为非人灵长类模型的补充, 创建人类疾病的树鼩模型是一个非常有前景的发展策略。核基因组和线粒体基因组研究表明, 狐猴、树鼩、灵长类是亲缘关系最密切的姐妹。树鼩广泛分布于我国西南地区 (云南、四川、西藏、贵州、广西等) 和东南亚。树鼩体型小, 体重为 100～250 g, 无明显

繁殖季节, 妊娠期大约45天, 每胎2～4只, 有利于饲养、繁殖和研究。国际上之所以选择比格犬进行药物长期毒性评价, 是因为比格犬温顺、神经发育良好，易于显示药物的长期毒性。树鼩的神经系统高度发育, 前额叶皮层结构已经与懒猴接近, 与丘脑之间已经形成双向投射, 脑体重比是包括人类的所有动物中最高的。利用树鼩进行药物长期毒性评价、创制新型的人类疾病的动物模型, 可能均具有更好的临床意义。此外, 现有动物物种中，仅有树鼩、猩猩和人类对 HBV 有易感性, 创制 HBV 的树鼩模型就具有不可替代性, 一旦成功不仅可广泛应用于新药评价,也可广泛应用于疾病的预测、预防、诊断等研究。树鼩对心理应激极其敏感, 适合于建立社会竞争失败病因学抑郁症模型。树鼩有自发糖尿病、近视等疾病，其发病机理与人类几乎完全相同。实际上, 由于对树鼩的研究极少, 人类疾病的树鼩模型研究更少, 有可能树鼩也适合许多其他重大疾病的动物模型研究, 有待于深入探索，例如树鼩自发肿瘤率极高、饮酒不醉等，但研究报道甚少。由于树鼩及人类疾病的树鼩模型在人口健康领域的良好前景, 且形成一个遗传背景清晰可控的树鼩品系 (昆明树鼩品系) 耗时很长, 这都需要国家层面长期、稳定的大力支持。

5　人类疾病的动物模型的重要性

发现活性物质的最佳策略无疑是高通量、高内涵的靶点或功能筛选。然而, 考虑到活性物质的成药性问题, 这种策略却导致新药研发的成功率极低。因为无论是有效性还是毒性都需要在活体动物和活体人体试验中去验证。国际上推崇高通量、高内涵的靶点或功能筛选很大程度上是因为经济成本、动物伦理的缘故, 不得不忍受新药研发后期的高风险。如果从活性物质的筛选就使用人类疾病的动物模型, 发现其剂量−效应关系、给药时间−效应关系、效应的物质结构依赖性等特点, 试验结束后观测几周动物健康状态、内脏器官病理和死亡情况等，将对新药研发后期的吸收、代谢、安全性等问题有很好地阐述，就可规避许多新药研发风险。简言之就是在人类疾病的动物模型中有效、无毒以阐明该活性物质的成药性。许多时候因为供试品量小而放弃动物模型筛选。如果仔细测算, 仍然有规律可寻。一般来讲 1～10 mg/kg 的剂量，如果在人类疾病的动物模型中无效, 需要更高的剂量才有效, 那么该活性物质在后期研发中的成药性, 可能会因毒副作用而受到限制的可能性更大。活性筛选过程中, 剂量从低到高, 动物也可反复使用, 5～10 mg就可确定该物质是否有活性。而靶点筛选或体外筛选也常需要几毫克供试品, 相比之下, 人类疾病的动物模型筛选所需要的供试品量是完全可以接受的, 因为一旦有活性, 就已经排除了许多后期问题。人类疾病的动物模型筛选中, 重要的是专门的熟练技术员在双盲的条件下固定地操作实验, 以确保实验的客观性和稳定性。

6　动、植物来源的传统中药资源是成药性的最佳基础

传统中医药验方已经广泛应用于人类疾病治疗，其安全性和有效性有一定保障。依据中医药验方, 挖掘动、植物来源的传统中药资源中的天然物质, 并用理想的人类疾病的动物模型进行活性筛选和药效学评价, 很大程度上既可避免该活性物质新药临床试验的无效,又可避免新药临床试验的毒性问题。我国特别是云南省拥有世界上最丰富的生物多样性资源, 赋予了我国天然活性物质新药研发的宝库和独特的疾病研究及新药评价的动物模型创制优势，是新药研发源头创新的根本基础之一。

中国科学院昆明动物研究所开展了长达几十年的活性多肽和动物毒素研究，取得了系列重要成果，同时长期以来也为中国科学院昆明植物研究所提供了天然物质的活性筛选和药效评价。从云南省特有动植物资源中发现的几千种天然物质中, 得到一系列药物先导分子和候选分子, 并在植物所和动物所的密切合作下研发了抗艾滋病、抗老年痴呆、抗抑郁症等新药。因此, 如能进一步发展壮大“中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室”, 把动植物和微生物资源、动植物化学、动物模型等资源性和技术性优势转化为集成体系优势, 将在昆明地区形成具有国际影响力的新药研发源头创新的集成体系，将为我国新药创制赶超世界一流水平, 为响应云南省政府大力发展生物医药支柱产业奠定良好基础。

致谢：中国科学院昆明动物研究所姚永刚研究员、梁 斌研究员、陈策实研究员、赵旭东研究员、胡新天研究员对本文给予批评指正, 谨致谢意。

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 4−10 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01004

野生和人工繁育树鼩部分生理指标检测与比较



马旭通[1,3], 李福林[2], 蒋宏君[2], 李文辉[1], 张 云[1,*], 杜廷义[1,2,3,*]

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;
2. 云南省第一人民医院 检验科, 云南 昆明 650032; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要：比较野生和人工繁育树鼩的部分生理指标, 为人类疾病的动物模型创制提供基本参数。血液采自昆明地区 54 只野生树鼩 (被捕获后人工饲养 1—2 月)和 54 只子一代人工繁育树鼩。该研究首次报道在两组动物中, 肌酸激酶、肌钙蛋白 I、总胆汁酸、果糖胺、低密度脂蛋白胆固醇等在性别间差异无显著性；这些指标在人工繁育树鼩中的中位数 (四分位数间距) 依次为：1449 (956) U/L、5.94 (7.23) μg/L、15.6 (19.7) μmol/L、393.5 (80.8) μmol/L 和 0.36 (0.32) mmol/L；在野生树鼩中依次为：986 (564) U/L、4.01 (4.10) μg/L、20.0 (20.6) μmol/L、379.0 (104.0) μmol/L 和 0.46 (0.23) mmol/L。人工繁育树鼩生理指标表现出个体间离散程度降低趋势, 但个别反映肝脏功能及心肌情况的指标表现出平均值上升, 个体离散程度扩大的现象。这些生理指标为人类疾病的树鼩模型创制打下了基础。

关键词：野生树鼩; 人工繁育树鼩; 血液样本; 生理指标; 比较
中图分类号：Q95-33; Q959.832 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0004-07

Detection and comparison of physiological indexes in the wild and laboratory tree shrew

MA Xu-Tong[1, 3], LI Fu-Lin[2], JIANG Hong-Jun[2], LI Wen-Hui[1], ZHANG Yun[1,*], DU Ting-Yi[1, 2, 3,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, *Kunming Yunnan* 650223, *China*; 2. *Department of Clinical Laboratory Medicine*, *The First People's Hospital of Yunnan Province*, *Kunming Yunnan* 650032, *China*; 3. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: To provide fundamental basis for the tree shrew models of human diseases, we examined and compared the physiological and biochemical indexes between wild and laboratory tree shrews. Blood samples were taken from 54 wild tree shrews that were housed in laboratory for 1 − 2 months, and from 54 first-generation of the laboratory tree shrews; each group had nearly equal male and female composition. Some of the first reported physiological and biochemical indexes were showed no significant differences between genders, and these indexes in laboratory tree shrews were as follows [medium (inter-quartile range)]: CK 1449 (956) U/L, CTNI 5.94 (7.23) μg/L, TBA15.6 (19.7) μmol/L, FRUC 393.5 (80.8) μmol/L and LDL-C0.36 (0.32); and in the wild tree shrews, 986 (564) U/L, 4.01 (4.10) μg/L, 20.0 (20.6) μmol/L, 379.0 (104.0) μmol/L and 0.46 (0.23) mmol/L, respectively. In the laboratory tree shrews, the variations of physiological and biochemical indexes were smaller, but the mean values of some indicators related to liver and heart functions became higher. These data would be valuable for the development of tree shrew models of human diseases.

Key words: Tree shrew; Wild tree shrew; Laboratory tree shrew; Blood samples; Physiological and biochemical indexes

目前, 捕捉后经短期饲养的野生树鼩 (*Tupaia belangeri*) 仍然是国内实验用树鼩的主要来源, 但随着其种群的发展, 人工繁育树鼩将取代野生树鼩并逐步发展到标准化实验动物。在 1991 年出版的

收稿日期：2010-12-01; 接受日期：2010-12-29
基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-EW-R-11）；中国科学院基础前沿研究专项项目(KSCX2-EW-J-23)；中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室资助项目
*通讯作者(Corresponding authors), E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn; timkally@hotmail.com
第一作者简介：马旭通 (1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail:mxt07@126.com

第一部系统反映我国树鼩一般生物学特征的专著——《树鼩生物学》中, 20世纪70—80年代对野生树鼩 (*T. b. chinensis*) 所进行的血液生物化学和血液细胞学研究结果已得到了较为全面的总结(Peng et al, 1991)。本次研究拟在现有资料的基础上, 增加检测代谢综合症常用评价指标：果糖胺、糖化血红蛋白、C肽、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇, 反映心肌功能情况的指标：肌酸激酶、乳酸脱氢酶和肌钙蛋白 I, 以及反映肝脏合成代谢功能的重要指标：总胆汁酸, 并比较野生树鼩和人工繁育树鼩血液样本生理指标检测值之间的差异。其中, 新增指标及在同等条件下, 不同种群间血液样本生理指标的比较属首次报道。

1　材料与方法

1.1　实验动物

1.1.1　本次实验共用树鼩 108 只, 其中：野生成年树鼩 54 只, 雌雄各半, 其体重为：雌性 95～131 g (平均 114.2 g), 雄性 108～143 g (平均 117.8 g)。它们均为在昆明地区捕获后人工饲养 1—2 月。

子一代人工繁育成年树鼩 54 只, 月龄：6—8 个月, 雌雄比为 26∶28。体重∶雌性 82～127 g (平均 107.2 g), 雄性 91～139 g (平均 115.1 g)。

1.1.2　饲养条件：捕获的野生树鼩和人工繁育树鼩在相同条件下进行人工饲养——普通级动物房, 一般每只笼具中放置一只树鼩, 保持安静环境, 维持室内温度在15～24 ℃, 湿度范围在50%～70%, 人工光照 12 h。每天喂食 2 次, 上午 10 点左右喂食全价营养粉蒸糕, 下午 4 点左右喂食水果, 每星期加喂一次黄粉虫, 自由饮水。饲料配方及主要营养成分, 树鼩在不同生理阶段的饲养条件要求及管理详见 Peng et al (1991)。

1.2　检测标本的采集

1.2.1　树鼩的适应性饲养

将树鼩由养殖基地转入本研究所动物实验中心树鼩饲养室进行适应性饲养 2—3 天。饲养条件同养殖基地, 实验前一天下午喂食后, 清扫笼具内残留食物。

1.2.2　血样采集

树鼩保定, 兽用氯胺酮(剂量：15 mg/100 g 体重)麻醉, 开胸法心脏采血(Wu & Zhang, 2007)。分注 1mL 血样于 EDTA-K_2 抗凝管 (武汉致远医疗科技有限公司)中，颠倒混匀。其余血样注于 VACUTTE 血清分离胶促凝管 (奥地利 Greiner 公司), 及时离心送检。

1.3　样本检测

血常规检测使用 EDTA-K_2 抗凝血样本，生化及免疫检测使用血清样本。

1.3.1　检测设备

美国雅培 CELL-DYN3700 全自动血球分析仪、Ci16200 免疫生化检测系统, 瑞士罗氏 E170 全自动免疫分析仪。

1.3.2　检测试剂

血常规检测采用雅培 CELL-DYN3700 配套试剂, C 肽检测采用罗氏 E170 配套试剂, 酶类检测采用雅培 Ci16200 配套试剂, 其他生化检测采用日本积水医疗株式会社产品。

1.3.3　检测

按不同设备的样本要求分别弃除溶血、脂血, 微小凝块等不合格标本后严格按相关操作程序进行实验检测和质量控制。

1.4　数据处理

数据处理采用 SPSS 13.0 软件包。对各组数据分性别各自弃除极端值和离群值后, 判断性别间差异的显著性; 对差别无显著性的指标合并数据, 重新弃除离群值，使用中位数、四分位数描述各检测值的分布特征; 正态数据的指标进一步计算其均值和标准差。统计判断：正态数据资料采用 t 检验, 非正态资料采用秩和检验, 变异系数比较采用 u 检验。

2　结果

2.1　野生组树鼩的检测结果（见表 1）。

2.2　人工繁育组树鼩的检测结果（见表 2）。

2.3　对在两组中均能进行雌雄合并的 15 个指标进行两组间比较结果

肌酸激酶、碱性磷酸酶、伽马谷氨酰胺转氨酶、低密度脂蛋白、果糖胺、尿素氮、肌钙蛋白 I、白细胞计数、血红蛋白、血小板计数等 10 个指标间的差别具有显著性 (P 值均小于 0.05)。

3　讨论

由于其独特的分类学地位及解剖学、生理学特性, 树鼩早已作为人类疾病动物模型被广泛应用于生物医学研究的诸多领域 (Peng et al, 1991)。众多的研究资料显示：树鼩除在病毒性肝炎、肝细胞

表 1 野生组树鼩常用生化及血常规指标检测结果

Tab. 1 Biochemical and hematological index values of wild tree shrews

检测项目 (单位) Item (unit)	性别 Gender	例数 Num.	中位数 Medium	四分位数 Q_L	 Q_U	算术平均值 Mean	标准差 *SD*
肌酸激酶 CK (U/L)	雌雄合并	48	986.00	647.00	1211.00	980	383
乳酸脱氢酶 LDH (U/L)	雌雄合并	52	1217.00	823.00	1530.00	1218	466
天门冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L)	雌雄合并	49	201.00	152.00	237.50	198.4	60.1
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L)	雌雄合并	49	67.00	46.50	95.50	73.6	36.6
碱性磷酸酶 AKP (U/L)	雌雄合并	49	106.00	84.00	141.50	116.2	47.9
γ-谷氨酰胺转氨酶 γ-GT (U/L)	雌雄合并	49	9.00	6.00	15.50	—	—
总胆红素 TBIL (μmol/L)	雌雄合并	50	0.70	0.30	1.10	—	—
总胆汁酸 TBA (μmol/L)	雌雄合并	52	20.00	12.10	32.60	—	—
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C (mmol/L)	雌雄合并	50	0.46	0.33	0.56	0.46	0.15
葡萄糖 GLU (mmol/L)	雌雄合并	48	5.20	3.60	7.35	5.46	2.51
果糖胺 FRUC (μmol/L)	雌雄合并	53	379.00	322.50	426.50	371.7	73.6
尿素氮 BUN (mmol/L)	雌雄合并	48	5.95	4.13	7.60	—	—
肌钙蛋白 I CTNI (ng/mL)	雌雄合并	52	4.01	2.10	6.20	—	—
空腹 C 肽 CP-K (ng/mL)	雌雄合并	50	0.74	0.36	1.46	—	—
白细胞计数 WBC (10E9/L)	雌雄合并	44	0.63	0.40	1.04	0.72	0.43
血红蛋白 HGB (g/L)	雌雄合并	49	137.00	99.00	147.00	—	—
血小板计数 PLT (10E9/L)	雌雄合并	48	621.50	537.80	757.50	640.9	163.1
总蛋白 TP (g/L)	雌性	22	61.00	58.00	65.00	62.3	5.2
	雄性	26	51.50	45.80	61.80	51.4	12.9
白蛋白 ALB (g/L)	雌性	24	28.50	27.00	31.00	28.5	3.3
	雄性	26	23.00	20.00	27.50	23.3	6.0
球蛋白 GLOB (g/L)	雌性	27	33.00	29.00	38.00	33.6	6.8
	雄性	26	27.50	23.80	33.30	28.1	7.6
总胆固醇 CHOL (mmol/L)	雌性	26	2.40	2.20	2.73	2.45	0.43
	雄性	26	2.00	1.40	2.30	1.88	0.60
甘油三酯 TG (mmol/L)	雌性	27	0.63	0.49	0.98	0.73	0.33
	雄性	26	0.51	0.16	0.77	0.52	0.35
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C (mmol/L)	雌性	27	1.23	1.08	1.44	1.24	0.23
	雄性	26	1.08	0.72	1.31	0.99	0.38
糖化血红蛋白 A1C% HBA1C% (%)	雌性	24	4.34	3.98	4.55	—	—
	雄性	22	4.05	3.77	4.12	—	—
肌酐 CREA (μmol/L)	雌性	25	17.00	14.00	19.00	17.0	3.1
	雄性	24	14.00	12.00	15.00	—	—
C 反应蛋白 CRP (mg/L)	雌性	27	0.43	0.40	0.46	0.43	0.04
	雄性	26	0.40	0.37	0.43	—	—
红细胞计数 RBC (10E12/L)	雌性	21	7.85	7.37	8.44	7.93	0.59
	雄性	25	7.35	5.24	9.02	6.97	2.15

表中“—”为因对应项目呈非正态分布产生的统计缺省值 (The hyphens in the Table are missing values)。

AKP: Alkaline phosphatase; ALB: Albumin; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; BUN: Urea nitrogen; CHOL: Total cholesterol; CK: Creatine kinase; CP-K: Fasting C peptide; CREA: Creatinine; CRP: C-reactive protein; CTNI: Troponin I; FRUC: Fructosamine; GLOB: Globulin; GLU: Glucose; HBA1C%: Glycosylated hemoglobin A1%; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; HGB: Hemoglobin; LDH: Lactate dehydrogenase; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol; PLT: Platelet count; RBC: Red blood cell count; TBA: Total bile acids; TBIL: Total bilirubin; TG: Triglyceride; TP: Total protein; WBC: White blood cell count; γ-GT: γ-glutamine transaminase.

表 2　人工繁育组树鼩常用生化及血常规指标检测结果

Tab. 2　Biochemical and hematological index values of laboratory tree shrews

检测项目 (单位) Item (unit)	性别 Gender	例数 Num.	中位数 Medium	四分位数 Q_L	Q_U	算术平均值 Mean	标准差 *SD*
肌酸激酶 CK (U/L)	雌雄合并	46	1449.00	961.00	1917.00	—	—
天门冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L)	雌雄合并	48	230.50	154.00	313.30	—	—
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L)	雌雄合并	48	83.50	46.00	121.80	—	—
碱性磷酸酶 AKP (U/L)	雌雄合并	51	142.00	102.00	220.00	—	—
γ-谷氨酰胺转氨酶 γ-GT (U/L)	雌雄合并	50	4.00	3.00	7.00	—	—
总胆红素 TBIL (μmol/L)	雌雄合并	53	0.60	0.30	0.85	—	—
总胆汁酸 TBA (μmol/L)	雌雄合并	51	15.60	7.90	27.60	—	—
白蛋白 ALB (g/L)	雌雄合并	49	32.00	30.00	34.00	—	—
总胆固醇 CHOL (mmol/L)	雌雄合并	50	2.40	2.00	2.90	2.39	0.63
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C (mmol/L)	雌雄合并	50	1.11	0.97	1.36	1.15	0.28
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C (mmol/L)	雌雄合并	51	0.36	0.22	0.54	—	—
葡萄糖 GLU (mmol/L)	雌雄合并	51	4.90	3.70	5.50	—	—
果糖胺 FRUC (μmol/L)	雌雄合并	50	393.50	364.00	444.80	402.9	58.8
尿素氮 BUN (mmol/L)	雌雄合并	48	8.80	7.63	10.95	—	—
肌酐 CREA (μmol/L)	雌雄合并	49	15.00	13.00	18.50	15.8	3.7
肌钙蛋白 I CTNI (ng/mL)	雌雄合并	53	5.94	3.50	10.74	—	—
C 反应蛋白 CRP (mg/L)	雌雄合并	53	0.42	0.39	0.44	0.42	0.04
白细胞计数 WBC (10E9/L)	雌雄合并	49	0.34	0.25	0.66	—	—
红细胞计数 RBC (10E12/L)	雌雄合并	47	7.94	7.33	8.68	7.99	0.92
血红蛋白 HGB (g/L)	雌雄合并	47	148.00	136.00	162.00	149.2	15.5
血小板计数 PLT (10E9/L)	雌雄合并	51	587.00	479.00	661.00	565.6	153.5
乳酸脱氢酶 LDH (U/L)	雌性	26	1530.00	762.00	2107.00	1438	699
	雄性	25	947.00	715.00	1266.00	—	—
总蛋白 TP (g/L)	雌性	25	69.00	66.50	72.50	69.2	4.1
	雄性	23	65.00	62.00	69.00	65.0	5.9
球蛋白 GLOB (g/L)	雌性	26	37.00	35.00	39.30	36.8	3.1
	雄性	25	32.00	28.00	37.00	32.0	5.9
甘油三酯 TG (mmol/L)	雌性	22	0.52	0.44	0.56	0.51	0.10
	雄性	28	0.43	0.32	0.54	0.40	0.19
糖化血红蛋白 A1C% HBA1C% (%)	雌性	25	4.53	4.31	4.81	4.56	0.30
	雄性	25	4.22	4.00	4.48	4.22	0.31
空腹 C 肽 CP-K (ng/mL)	雌性	24	1.03	0.54	1.66	1.14	0.86
	雄性	24	0.35	0.12	0.86	—	—

表中 “—”为因对应项目呈非正态分布产生的统计缺省值; 英文缩写同表 1 (The hyphens in the table are missing values; the abbreviations are the same with Tab. 1).

癌、近视及心理社会应急等人类疾病的实验研究活动中，表现出了其他实验动物所没有的优良品性(Cao et al, 2003)以外，还被广泛应用于代谢性疾病(Liu et al, 2010; Meng et al, 2005)、药物毒理 (Yu et al, 2004) 及神经生理学 (Keuker et al, 2004) 等领域的实验研究工作。

在应用领域日益发展的同时，实验树鼩的人工驯养繁殖等基础研究工作也受到了进一步的关注(Jiao et al, 2009)。有关中缅树鼩在实验室驯化过程中所发生的体重、颅长、体长、尾长等基本体尺指标的变化，已见对比研究报道 (Yu et al, 2002)。本实验拟在同等实验条件下，通过对野生组和人工繁育组两组树鼩部分生理指标检测值的比较，从实验诊断学的角度探讨树鼩在由野生到实验室繁育这

一种群变化过程中所发生的生理改变, 同时对一些诊断效能优良的临床检测项目在树鼩中的应用进行初步探索。

对本次实验检测的结果分析显示：与野生组相比较, 人工繁育组的总体变化趋势是生理指标在性别间差异缩小及在个体间离散程度降低。而与这种趋势不一致的项目主要集中在反映肝脏功能及心肌情况的项目上。这些项目表现出了一定程度的平均值上升和个体离散程度扩大。这一变化趋势与人工饲养营养条件之间的关系及其影响应引起更多的关注。

比较中显现出的另一个突出变化是血液葡萄糖分布。54 只野生树鼩得到 53 个检测值, 其中 5 个离群值均为高值, 分别是：14.9、15.8、16.2、21.1 和 23.4 mmol/L, 19 个检测样本的血糖值高于 7.0 mmol/L。野生树鼩中存在个体空腹血糖水平较高的现象早已发现, Elliot & Wong (1969) 的研究推论认为“高的血糖值也许不一定表明树鼩中的糖尿病, 树鼩易怒的秉性也许是由于血糖升高所致”(Peng et al, 1991), 但这一推测一直未得到进一步的实验论证。而新的代表机体检测前中期(1～2 周)及长期(8～12 周) 血糖水平的果糖胺、糖化血红蛋白指标的引入, 有助于解释这一现象。

以 7.0 mmol/L 为限将此 53 只树鼩分为两组, 其葡萄糖代谢相关指标的比较结果见表 3。

表 3 葡萄糖代谢相关指标比较

Tab. 3 The comparison of glucose- metabolic indicators

指标(单位) Item (unit)	组别 Group (cases)	平均值 Mean	标准差 *S.D.*	*P* 值 P level
果糖胺 FRUC (μmol/L)	1 (34)	391.8	73.0	<0.05
	2 (19)	335.9	61.4	
糖化血红蛋白 A1C% HBA1C% (%)	1 (34)	4.15	0.35	>0.05
	2 (19)	3.89	0.49	
空腹 C 肽 CP-K (ng/mL)	1 (34)	0.62	0.45*	<0.05
	2 (19)	2.16	1.40	

组别 1 为血糖值≤7.0 mmol/L, 组别 2 为血糖值≥7.2 mmol/L。*: 该组数据呈非正态分布。英文缩写同表 1。

Group 1: the value of serum glucose are no more than 7.0 mmol/L, and group 2: no less than 7.2 mmol/L. * means non-normal distribution of the corresponding group. The abbreviations are the same with Tab. 1.

表 3 显示, C 肽水平的变化与即刻血糖水平高低相匹配, 而即刻血糖较高的树鼩在检测前中长期及长期的血糖水平并不高于同组即刻血糖值较低者。由此可以基本判断采样时部分树鼩个体的高血糖状态应属于一过性的应激性血糖升高, 而不是树鼩生理水平的真实反映。而人工繁育组血糖检测值的分布情况, 也从另一个侧面支持这一判断。

新的能更灵敏、更特异、更稳定地反映机体生理病理变化的检测指标的引入和尝试, 是本次实验研究的目的之一。本次实验对血常规、肝肾功能、糖、脂代谢、心肌标志物、肿瘤标志物、急性时相反应蛋白等检测指标进行了较为广泛的尝试。其中, 前白蛋白、癌胚抗原、甲胎蛋白、胰岛素检测值大多低于检测系统的检测下限, 而肌红蛋白检测值远高于人类正常值乃至病理值, 且近一半高于系统的检测上限。与检索到的文献比较, 本次研究首次报道了肌酸激酶、乳酸脱氢酶、总胆汁酸、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、果糖胺、糖化血红蛋白、C 肽和肌钙蛋白 I 在正常树鼩中的检测值分布。所尝试的指标在临床医学中均得到了广泛应用并被循证医学证明具有良好的临床诊断效能。尽管这些指标在树鼩动物模型中的应用尚有待更加充分的研究资料加以佐证, 但果糖胺和糖化血红蛋白对树鼩血糖变化的甄别作用已然初步显现。

比较分析中同时发现, 树鼩的部分生理指标检测值分布的离散趋势较大, 而在近期的同类研究报告中也存在相似的情况 (Bai et al, 2009; Xie et al, 2007), 本组数据中雌雄合并后呈正态分布的检测项目与相似报导间变异系数的比较结果见表 4, 表 5。

离散趋势过大不仅直接影响到样本均数的代表性, 而且也会对同批次小样本动物实验结果的解释带来难以识别和排除的干扰。对于导致实验树鼩部分生理项目检测值离散趋势较大的原因, 除树鼩的个体差异, 及在采样过程中由于较强的应激反应特性和麻醉程度可能不一致产生的干扰外, 检测方法和检测过程带来的影响也不容忽视。就检测方法而言, 目前在使用中应引起注意的是建立在抗原抗体反应基础上的定量检测试验。

抗原抗体反应是特异性结合反应, 在无相应检测抗体的条件下, 可以借用其他物种的抗体, 但作为关键试验参数的交叉程度、反应特异性、灵敏度、线性等大多因没有物种特有的标准品而未得到评估, 其结果是使得检测结果的准确性和实验室间的可比性难以保证。以本次实验结果为例, 难以准确判断与人类同一项目检测值分布接近但低于人类水平的 C 肽, 相去甚远的肌红蛋白、肌钙蛋白是否

表 4　野生短期饲养组树鼩与 Bai et al (2009) 结果的变异系数比较
Tab. 4　The comparison of CV values between wild tree shrews and Bai et al (2009)

检测项目(单位) Item(Unit)	本文 This article			文献报道 Bai et al (2009) Bai et al (2009) report			u 值 u value	P 值 P level
	例数 Num.	平均值 Mean	变异系数 (%) CV (%)	例数 Num.	平均值 Mean	变异系数(%) CV(%)		
天门冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L)	49	198.4	30.3	140	93.94	76.5	6.150	<0.01
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L)	49	73.6	49.7	140	30	102.0	4.236	<0.01
葡萄糖 GLU (mmol/L)	48	5.46	46.0	140	3.7	34.6	1.880	>0.05
白细胞计数 WBC (10E9/L)	44	0.72	59.7	140	2.21	42.1	1.997	<0.05
血小板计数 PLT (10E9/L)	48	640.9	25.4	140	430.86	14.1	3.930	<0.01

英文缩写同表 1(The abbreviations are the same with Tab. 1)。

表 5　人工繁育组树鼩与 Xie et al (2007) 结果的变异系数比较
Tab. 5　The comparison of CV values between laboratory tree shrews and Xie et al (2007)

检测项目 (单位) Item (Unit)	本文 This article			文献报道 Xie et al (2007) Xie et al (2007) report			u 值 u value	P 值 P level
	例数 Num.	平均值 Mean	变异系数 (%) CV (%)	例数 Num.	平均值 Mean	变异系数 (%) CV (%)		
肌酐 CREA (μmol/L)	49	015.80	23.4	22	16.63	37.2	2.026	<0.05
C 反应蛋白 CRP (mg/L)	53	000.42	09.5	22	2.40	51.3	4.352	<0.01
红细胞计数 RBC (10E12/L)	47	007.99	11.5	22	8.19	09.3	1.205	>0.05
血红蛋白 HGB (g/L)	47	149.20	10.4	22	155.00	09.4	0.567	>0.05
血小板计数 PLT (10E9/L)	51	565.60	27.1	22	450.17	14.5	3.457	<0.01

英文缩写同表 1(The abbreviations are the same with Tab. 1)。

属于本组树鼩的真实反应；再如树鼩胰岛素的检测。本次实验采用雅培的化学发光检测系统，胰岛素检测值集中分布于系统的检测下限(0.2 mU/L)附近，而 Meng et al (2005)采用放射免疫分析法检测树鼩空腹血清胰岛素水平，正常对照为 (4.2±0.8) mU/L。此水平仅接近于人类正常参考范围(6～25 mU/L) 的下限 (Lü et al, 2004)，而该实验组树鼩的血糖水平与人类正常参考范围基本一致，这种差异说明树鼩血清胰岛素的真实水平问题尚有待于对检测方法的论证与确定。

即使是成熟的检测技术，在检测过程中也会发生较大的偏差，进而影响到对实验结果的判断。在本次实验检测中，白细胞计数检测值低于 Xie et al (2007)使用同一型号检测设备的报道；而 Xie et al (2007)的结果与 Bai et al (2009)的相似，且两者皆接近 Zou et al (1983)的研究结果。从方法学角度分析，邹如金等使用的显微镜计数方法的可靠性要优于基于电阻法测定、光电信号转换的自动计数方法。因此，有理由认为在本次检测中，白细胞计数出现了明显的系统误差。这类误差同样也可能存在于基于同一检测原理的其他检测项目中。

检测方法和检测过程中类似误差对实验结果解释的不利之处，不仅在于会使不同实验室间的结果难以比较；而且更为不利的是可能会模糊或掩盖同一批次实验，不同处理组别之间的差距，从而导致结果判断失真。而要识别和控制实验检测中潜在的类似误差，则需要与检测项目对应，与检测样本具有反应一致性的校准品及质控物。

综上所述，实验树鼩的开发利用已经进入了一个新的发展时期。随着实验树鼩在人类疾病动物模型领域的广泛应用，对实验结果的重现性，实验结果间的可比性要求将逐步提高。树鼩的人工繁育将会有效地减低树鼩个体间的变异程度，提高实验结果的可比性。与此同时，开发与疾病模型动物相适应的检测方法，寻找更稳定的、诊断效能更佳的检测指标，以满足科研活动的需求，开发适用于实验

树鼩的基准物质和质控品，对现有检测方法的可利用性和可信度加以评估，以保障实验结果的准确度和精密度，这也是实验树鼩标准化建设工作中不可或缺的有机组成部分。

参考文献：

Bai JL, Sun XM, Wang X, Dai JJ. 2009. Measurement and analysis of hematological and biochemical value in captive bred tree shrew[J]. *Chn J Comp Med*, **19**(7): 38-41. [白继丽, 孙晓梅, 王欣,代解杰. 2009. 人工饲养树鼩血液学及生化指标正常值测定及分析. 中国比较医学杂志, **19**(7): 38-41.]

Cao J, Yang EB, Su JJ, Li Y, Chow P. 2003. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research[J]. *J Med Primatol*, **32**(3): 123-130.

Elliot O, Wong M. 1969. Blood sugar of Malayan tree shrews[J]. *J Mammal*, **50**(2), 361-362.

Jiao JL, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Zheng H, Shen PP. 2009.The development and use of tree shrew resource and its standards research—the strategic discussion for laboratory animal resource development in china[J]. *Chn J Comp Med*, **19**(7): 73-78. [角建林, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 郑红, 沈培清. 2009. 树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨. 中国比较医学杂志, **19**(7): 73-78.]

Keuker JI, de Biurrun G, Luiten PG, Fuchs E. 2004. Preservation of hippocampal neuron numbers and hippocampal subfield volumes in behaviorally characterized aged tree shrews[J]. *J Comp Neurol*, **468**(4): 509-517.

Liu HR, Wu G, Zhou B, Chen BS. 2010. Low cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities are the factors making tree shrew and beijing duck resistant to atherosclerosis[J]. *Lipids Health Dis*, **9**: 114.

Lü Y, Zhu HM, Shen X, Chen MS, Zhao WG, Pan BS (translated), 2004. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results (Edited by Lothar Thomas)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers. [吕元, 朱汉民, 沈霞, 陈铭生, 赵伟国, 潘伯申. 2004. 临床实验诊断学——实验结果的应用和评估[M]. 上海: 上海科学技术出版社.]

Meng BH, Liu H, Liang Y, Huang S, Suan X. 2005. Investigation of pathogenesis of diabetic myopathy of skeletal muscle in experimental type 1 diabetes mellitus of tree shrews[J]. *Chn J Diabetes*, **13**(4): 290-292. [蒙碧辉, 刘红, 梁莹, 黄松, 冼苏. 2005. 1 型糖尿病树鼩骨骼肌病变及其发病机制. 中华糖尿病杂志, **13**(4): 290-292.]

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese Tree Shrews [M]. Kunming:Yunnan Science and Technology Press. [彭燕章, 叶智彰, 邹如金, 王应祥, 田保平, 马原野, 施立明. 1991. 树鼩生物学. 昆明:云南科技出版社.]

Wu RS, Zhang J. 2007. The Modern Technology of Laboratory Animal Science[M]. Beijing: Chemical Industry Press. [吴端生, 张健. 2007. 现代实验动物学技术[M]. 北京: 化学工业出版社.]

Xie L, Qin X, Chen XY, Li S, Huang CN, Deng JH. 2007. Normal physiological laboratory value of tree shrew bred in laboratory[J]. *Sichuan J Zool*, **26**(3): 682-685. [谢丽, 秦雪, 陈晓燕, 李山, 黄春妮, 邓敬桓. 2007. 实验室繁育树鼩生理指标的检测分析. 四川动物, **26**(3): 682-685.]

Yu F, Li R, Wang R. 2004. Toxic effect of chloromycetin on the ultrastructures of the motor neurons of the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, **82**(4): 276-281.

Yu YM, Wu YQ, Wang SC, Luo HT, Yao M, Qian GS, Chang H. 2002. Laboratory domestication of *Tupaia belangeri chinensis*[J]. *J Shanghai Jiaotong Univ*: *Agricultural Science*, **20**(z1): 24-27. [于永梅, 吴一迁, 王生存, 罗海涛, 姚明, 钱耕荪, 常洪. 2002. 中缅树鼩的实验室驯化. 上海交通大学学报: 农业科学版), **20**(z1): 24-27.]

Zou RJ, Dai W, Ben KL, Song BY. 1983. Blood picture of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. *Zool Res*, **4**(3): 291-294. [邹如金, 代伟, 贲昆龙, 宋宝云. 1983. 树鼩 (*Tupaia belangeri*) 血象的研究. 动物学研究, **4**(3): 291-294.]

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 11−16 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01011

中缅树鼩自然感染六种病毒的血清流行病学

BACK

韩建保[1]，张高红[1]，段 勇[2]，马建平[1,4]，张喜鹤[1,4]，
罗荣华[1]，吕龙宝[3]，郑永唐[1,3,*]

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223；
2. 昆明医学院 第一附属医院检验科，云南 昆明 650032；3. 中国科学院昆明灵长类研究中心，
中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223；4. 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要：中缅树鼩作为一种新型实验动物，在医学生物学上，尤其是病毒学方面的应用受到越来越多的重视。实验动物自身病毒感染会影响动物健康和干扰实验结果，甚至危害实验人员生命安全。所以，实验动物病毒检测一直是动物质量控制的重要部分。中缅树鼩研究迄今缺乏清晰的病毒自然感染资料。为调查中缅树鼩的病毒感染状况，采集野生俘获和人工繁殖的中缅树鼩血清样本272份，全部血清样本通过ELISA方法对乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原，丙型肝炎病毒(HCV)总抗体，以及戊型肝炎病毒(HEV)、腺病毒(ADV)、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)和2型(HSV-2)的IgG抗体进行了检测。结果表明，ELISA初筛HBV表面抗原有3份阳性样本，但通过乙型肝炎两对半定量检测进一步确认为阴性；抗HCV抗体和抗HEV、ADV、HSV-1 IgG抗体检测均为阴性；抗HSV-2 IgG检测有1份阳性样本。提示仅抗原或抗体血清学指标检测树鼩肝炎结果并不能反应个体携带病毒的状态，应该再进行病毒学指标确认。同时建议中缅树鼩繁殖群应进行HSV-2的筛选，以便杜绝和控制该病毒的感染。

关键词：中缅树鼩；树鼩；自然感染；病毒；血清；流行病学
中图分类号：Q95-33; R373; Q959.832 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0011-06

Sero-epidemiology of six viruses natural infection in *Tupaia belangeri chinensis*

HAN Jian-Bao[1], ZHANG Gao-Hong[1], DUAN Yong[2], MA Jian-Ping[1, 4], ZHANG Xi-He[1, 4], LUO Rong-Hua[1], LÜ Long-Bao[3], ZHENG Yong-Tang[1,3,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Diseases Mechanism of the Chinese Academy of Sciences and Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, the *Chinese Academy of Sciences*, *Kunming Yunnan* 650223, *China*; 2. *The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College*, *Kunming Yunnan* 650032, *China*; 3. *Kunming Primate Research Center of the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming Institute of Zoology*, the *Chinese Academy of Sciences*, *Kunming Yunnan* 650223, *China*; 4. *Graduate University of the Chinese Academy Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Tupaia (*Tupaia belangeris chinensis*, tree shrew) as a new experiment animal in medicine are non-rodent, small animals and close to primates in evolution. Experimental animals infected with viruses will affect the animal's health, interference experiment, and even endanger the operator's safety. Therefore, the viral infection in experimental animals has long been considered an important part of quality control. Lack of clearer viral natural infection information on the *T. belangeris* limits its use. Six viruses infection in 272 wild capture and artificial breeding Tupaia were investigated in this study. All serum samples were detected for the hepatitis B virus surface antigen, the total antibodies of HCV, hepatitis E virus (HEV), adenovirus (ADV), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and herpes simplex virus type 2 (HSV-2) by ELISA. The results showed that anti-HCV antibody and anti-HEV, ADV, HSV-1 IgG antibodies were negative, only one sample was positive of anti-HSV-2 IgG.. Three samples were positive in the primary ELISA detection of HBV surface antigen, but two pairs of semi-quantitative detection of hepatitis B and further recognized as negative. The results implied that antigen or antibody-positive results appeared in the hepatitis serological test is not accurate

收稿日期：2010-12-15；接受日期：2010-12-30
基金项目：中国科学院基础前沿研究专项项目(KSCX2-EW-J-23)；中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室资助项目
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：韩建保 (1978—)，男，硕士，研究实习员，从事艾滋病动物模型研究

enough and confirmation by other virological indicators is necessary. Tupaia breeding herd should be screened for HSV-2 in order to prevent and control the virus infection.

Key words: Tree shrew; Tupaia; Natural infection; Virus; Serum; Epidemiology

中缅树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*)属攀鼩目(Scandentia)树鼩科(Tupaiidae), 是一种生长于热带和亚热带地区的小型动物, 其分布从马来半岛北部一直延伸到我国的南部和西南部以及喜马拉雅山区, 是东南亚树鼩分布最北的一个种。我国南部和西南很可能是树鼩分布的北限 (Peng et al, 1991)。中缅树鼩主要分布在云南、四川西南部、西藏东南部、贵州、广西和海南等地区。树鼩具有繁殖快、体型小、饲养成本低、进化程度高等特点 (Chen et al, 2008; Zhang & Ben, 2001; Li et al, 2009), 在生理机能、生化代谢和基因组方面与人类具有一定的相似性, 且远高于大鼠、小鼠、犬等实验动物 (Wang & Li, 2010), 曾被认为是低等的灵长类动物。因此, 树鼩具有比灵长类动物更适合大规模应用的优势, 其模式动物的创制、资源推广和疾病模型的建立对研究人类疾病及新药研发具有极其重要的价值。

自 20 世纪 80 年代以来, 树鼩被广泛用于人类病毒感染性疾病的实验动物模型研究。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV)、单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)、单纯疱疹病毒 2 型(herpes simplex virus type 2, HSV-2)、腺病毒 (adenovirus, ADV)等多种人类病毒能感染树鼩, 可能是感染性疾病的潜在重要模型动物 (Zhang & Ben, 2001; Ben, 1997; Yang et al, 2005; Amako et al, 2010)。虽然, 树鼩的人工饲养和繁殖已有 30 多年历史, 但迄今为止仍未建立纯种品系, 且病毒携带、生理生化、遗传背景等相关的基础生物学和重要生物学特性的数据仍然比较缺乏, 同时也缺乏可用于树鼩研究的相关试剂, 使得基于树鼩的动物模型研究工作缺少深度和广度, 在一定程度上影响了试验结果的分析。为了较全面地了解野生和人工饲养树鼩的自然病毒感染情况, 为树鼩实验动物的模式化、标准化及建立感染性疾病树鼩动物模型研究奠定基础, 本研究对 272 只野生和人工饲养繁殖的中缅树鼩自然感染 6 种病毒情况进行了血清学调查。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

272 只中缅树鼩血样来自中国科学院昆明动物研究所中国科学院灵长类研究中心, 其中野生中缅树鼩样本 200 份, 5—8 月龄繁殖群子一代样本 72 份。通过股动、静脉采集无抗凝血 1.0 mL/只 (Sun et al, 2009; Chen et al, 2009), 制备检测血清。

1.1.2 检测试剂盒

乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)诊断试剂盒, 批号为 201007031; 丙型肝炎病毒抗体(Anti-HCV antibodies)诊断试剂盒, 批号为 201007031; 戊型肝炎病毒 IgG 抗体 (Anti-HEV IgG antibodies)诊断试剂盒, 批号为 201005011, 均为上海科华生物工程有限公司产品。

单纯疱疹 1 型病毒 IgG ELISA 试剂盒, 批号为 20101102 和 20101125; 单纯疱疹 2 型病毒 IgG ELISA 试剂盒, 批号为 20101125; 腺病毒 IgG ELISA 试剂盒, 批号为 20101102 和 20101125, 均为北京四正柏生物科技有限公司产品。

1.2 方法

试验方法及结果判定均按照试剂盒说明书操作。

2 结果与讨论

有研究报道, 多种人类病毒可接种感染中缅树鼩。在我国, 用中缅树鼩实验感染 HBV 的研究起步于 20 世纪 80 年代, 肝炎病毒实验感染中缅树鼩目前是研究人员进一步研究和开发该模型的重要研究内容之一。为了较全面地了解野生和人工饲养树鼩的自然病毒感染情况, 为建立病毒感染性疾病树鼩动物模型研究奠定基础, 我们对野生和人工饲养子一代中缅树鼩可能流行的 6 种病毒感染进行了血清流行病学调查。

2.1 肝炎病毒的检测

对中缅树鼩自然携带肝炎病毒状况的研究, 将有利于树鼩实验动物的标准化、树鼩携带的肝炎病毒野毒株与人类肝炎病毒株的差异比较及中缅树

鼩肝炎动物模型的建立。

人 HBV 属嗜肝 DNA 病毒科正嗜肝 DNA 病毒属。黑猩猩对 HBV 非常易感并可在感染后出现类似人乙型肝炎的疾病，是 HBV 最理想的动物模型。HCV 属黄病毒科丙型肝炎病毒属，是一类具有包膜结构的单股正链 RNA 病毒。除人和黑猩猩是 HCV 自然宿主外，尚未发现其它自然动物对 HCV 易感 (Lanford et al, 1994)。虽然有利用黑猩猩、猕猴、树鼩、转基因鼠，以及人源化小鼠等动物作为 HCV 感染模型动物的研究，但黑猩猩仍然是目前惟一理想的模型动物。HEV 属嵌状病毒科戊型肝炎样病毒属,也是单股正链 RNA 病毒。戊型肝炎是一种人畜共患病，主要为粪—口途径传播。HEV 除可感染人和一些灵长类动物 (如狨猴、食蟹猴、猕猴、短尾猴、非洲绿猴、黑猩猩等) 外，也可感染猪、鹿等其他动物 (Meng et al, 1997; Kabrane et al, 1999; Breum et al, 2010)。

血清中 HBsAg (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)阳性是 HBV 感染的重要标志之一。本研究通过上海科华生物工程有限公司生产的乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒检测野生群 (200 份)和子一代(72 份)中缅树鼩血清样本 272 份，初筛检测出 HBsAg 阳性样本 3 份，阳性率为 1.10%(3/272)，其中野生群样本 2 份，子一代样本 1 份(表 1)。Li et al (1995)曾报道 48 只野生树鼩检出 6 只 HBsAg 阳性，阳性率为 12.5%，高于我们的检测结果。然而，我们进一步对 ELISA 检测阳性的 3 份样本进行了乙型肝炎两对半检测确证，确证结果却发现 3 份阳性样本的 5 项 HBV 指标均为阴性，定量检测中只发现野生群中有 1 份样本的 HBsAb 量为 10.82 mIU/mL(表 2)，高于正常参考范围 0～10 mIU/mL，由此分析认为这只野生中缅树鼩可能有既往乙型肝炎病毒感染史。

对野生群和子一代中缅树鼩 180 份血清样本进行丙型肝炎病毒总抗体检测，发现 180 份样本检测结果均为阴性 (表 3)。

对野生群和子一代中缅树鼩 180 份血清样本进行戊型肝炎病毒 IgG 抗体检测，发现 180 份样本检测结果均为阴性，可以初步判断该 180 只中缅树鼩体内无 HEV 感染(表 4)。

表 1　树鼩血清中乙型肝炎病毒表面抗原检测
Tab. 1　The screening of hepatitis B virus surface antigen in *Tupaia* serum

群体 Group	性别 Sex	样本数(份) Sample size	阳性数(份) Positive size	阳性率(%) Positive rate
野生群 Wild group	♀	130	1	0.77 (1/130)
	♂	70	1	1.43 (1/70)
子一代 First filial generation	♀	24	0	0 (0/24)
	♂	48	1	2.08 (1/48)
合　计 Total	♀	154	1	0.65 (1/154)
	♂	118	2	1.69 (2/118)

表 2　树鼩血清中 HBV 定量与定性检测结果比较
Tab. 2　Comparison of qualitative and quantitative detection of HBV in *Tupaia* serum

检测项目 Test item		HBsAg (ng/mL)	HBsAb (Miu/mL)	HBeAg (PEI U/mL)	HBeAb (PEI U/mL)	HBcAb (PEI U/mL)
0075	ELISA	3.589/+	NA	NA	NA	NA
	定量	0/-	10.82/+	0/-	0.04/-	0.38/-
0051	ELISA	2.482/+	NA	NA	NA	NA
	定性	0.295/-	1.514/-	0.162/-	2.180/-	2.265/-
0105	ELISA	4.113/+	NA	NA	NA	NA
	定性	0.171/-	0.143/-	0.029/-	2.134/-	2.056/-
0090	ELISA	1.730/-	NA	NA	NA	NA
	定性	0.124/-	0.200/-	0.114/-	2.244/-	1.844/-

HBsAg：乙肝表面抗原; HBsAb：乙肝表面抗体; HBeAg：乙肝 e 抗原;　HBeAb：乙肝 e 抗体; HBcAb：乙肝 c 抗体。定量参考值：HBsAg (ng/mL)：0.00－0.50; HBsAb (Miu/mL)：0－10; HBeAg (PEI U/mL)：0－0.5; HBeAb (PEI U/mL)：0－0.02; HBcAb (PEI U/mL)：0－-0.9; NA: no assay.

由于本研究所使用的乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒总抗体和戊型肝炎病毒 IgG 抗体检测试剂均为人源性病毒检测试剂盒，本文研究结果可能提示：1) 树鼩在自然环境下不感染人的乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒; 2) 树鼩的肝炎病毒不同于人的肝炎病毒，有较大的差异和同源性小; 3) 人和树鼩的抗体之间无或只有弱的交叉反应性。

表 3 树鼩血清中抗 HCV 抗体检测

Tab. 3 Detection of anti-HCV antibody in *Tupaia* serum

群体 Group	性别 Sex	样本数（份） Sample size	阳性数（份） Positive size	阳性率（%） Positive rate	阴性数（份） Negative size	阴性率（%） Negative rate
野生群 Wild group	♀	55	0	0 (0/55)	55	100 (55/55)
	♂	53	0	0 (0/53)	53	100 (53/53)
子一代 First filial generation	♀	24	0	0 (0/24)	24	100 (24/24)
	♂	48	0	0 (0/48)	48	100 (48/48)
合 计 Total	♀	79	0	0 (0/79)	79	100 (79/79)
	♂	101	0	0 (0/101)	101	100 (101/101)

表 4 树鼩血清中抗 HEV IgG 抗体检测

Tab. 4 Detection of anti-HCV IgG antibody in *Tupaia* serum

群体 Group	性别 Sex	样本数(份) Sample size	阳性数(份) Positive size	阳性率(%) Positive rate
野生群 Wild group	♀	55	0	0 (0/55)
	♂	53	0	0 (0/53)
子一代 First filial generation	♀	24	0	0 (0/24)
	♂	48	0	0 (0/48)
合 计 Total	♀	79	0	0 (0/79)
	♂	101	0	0 (0/101)

表 5 树鼩血清中抗 HSV-1 IgG 抗体检测

Tab. 5 Detection of anti-HSV-1 IgG antibody in *Tupaia* serum

群体 Group	性别 Sex	样本数(份) Sample size	阳性数(份) Positive size	阳性率(%) Positive rate
野生群 Wild group	♀	130	0	0 (0/130)
	♂	70	0	0 (0/70)
子一代 First filial generation	♀	24	0	0 (0/24)
	♂	48	0	0 (0/48)
合 计 Total	♀	154	0	0 (0/154)
	♂	118	0	0 (0/118)

2.2 单纯疱疹病毒检测

单纯疱疹病毒(HSV)属疱疹病毒科单纯疱疹病毒属。HSV 可分为 HSV-1 和 HSV-2。HSV-1 主要引起腰以上(非生殖器)感染，如疱疹性脑炎、脑膜炎、角膜炎、唇疱疹等；而 HSV-2 主要则与腰以下(生殖器)感染有关，如新生儿疱疹和生殖器疱疹。HSV 感染后病原不能彻底清除，病毒可潜伏在神经节，随时可被激活。HSV 感染在一定程度上将影响模型的实验结果。家兔、小鼠和豚鼠是最常用的 HSV 易感动物。

本研究对野生群和子一代中缅树鼩 272 份血清样本进行 HSV-1 IgG 抗体检测，结果显示均为阴性，初步判断 272 只中缅树鼩无 HSV-1 感染（表 5）。对野生群和子一代中缅树鼩 272 份血清样本进行 HSV-2 IgG 抗体检测，结果显示野生群有 1 份血清样本为阳性，在野生群中阳性率为 0.50%，在检测样本总数中阳性率为 0.37%。子一代 72 份血清样本均为阴性。从性别角度分析，在雄性个体中阳性率为 1.43%，雌性个体中无阳性样本（表 6）。这与关于树鼩感染疱疹病毒属病毒的报道基本相吻合(Darai & Matz, 1979; Mirkovic et al, 1970)。

Mirkovic et al (1970) 报道，从树鼩肺组织中分离到第 1 例树鼩疱疹病毒，且命名为 THV-1 (Tupaia herpesvirus-1, THV-1)，随后 Darai & Matz (1979)报道，从树鼩淋巴肉瘤中分离到 THV-2 和 THV-3 两株病毒，这 3 株病毒 DNA 有很大的相似性。近年未见关于树鼩自然感染疱疹病毒属病毒的报道，由于此次检测树鼩为中缅树鼩，而 Darai & Matz (1979)报道分离到 THV-2 和 THV-3 两株病毒的树鼩为泰国引进，从地域分布可以推定同属中缅树鼩群体。本研究采用的是人源 HSV-1 和 HSV-2 检测试剂盒，可能是构成调查结果阳性率偏低的一个原因。遗憾的是虽然已经有 THV 发现，且做了较深入研究，但是没有 THV 商业开发检测试剂盒，构成树鼩属 HSV 筛查困难。

表 6 树鼩血清中抗 HSV-1 IgG 抗体检测

Tab. 6 Detection of anti-HSV-2 IgG antibody in *Tupaia* serum

群体 Group	性别 Sex	样本数(份) Sample size	阳性数(份) Positive size	阳性率(%) Positive rate
野生群 Wild group	♀	130	0	0 (0/130)
	♂	70	1	1.43 (1/70)
子一代 First filial generation	♀	24	0	0 (0/24)
	♂	48	0	0 (0/48)
合 计 Total	♀	154	0	0 (0/154)
	♂	118	1	0.85 (1/118)

2.3 腺病毒检测

腺病毒(adenovirus, ADV)属腺病毒科。迄今为止, 至少发现有 100 多种腺病毒可感染人、哺乳动物和禽类。腺病毒可引起多种急性上呼吸道感染、急性眼结膜炎、急性出血性膀胱炎、急性小儿腹泻等。Chen et al (1987)报道, 从 90 份成年云南树鼩大便中检测到 12 份腺病毒阳性样本, 阳性率为 13%; Wu et al (1990)报道, 1981—1985 年从云南野生树鼩咽拭子、肾细胞培养物和粪便中分离出 10 株 TAV(tupaia adenovirus, TAV), 分别为树鼩咽拭子(3/38), 树鼩肾细胞培养物(6/19)和粪便(1/1), 且鉴定为 2 个血清型。我们对野生群和子一代中缅树鼩 272 份血清样本进行腺病毒 IgG 抗体检测, 其中雄性样本 154 份, 雌性样本 118 份。检测结果显示, 272 份血清样本均为阴性。因此, 初步判断 272 只中缅树鼩无腺病毒感染(表 7)。此次 ADV 检测结果与 Chen et al (1987)和 Wu et al (1990)的报道差别较大,可能最主要的原因是检测样本不同。同时, 我们实验检测采用的是人源 ADV 检测试剂盒, 也是构成以上试验结果出现的一个原因。

表 7 树鼩血清中抗 ADV IgG 抗体检测

Tab. 7 Detection of anti-HSV-2 IgG antibody in *Tupaia* serum

群体 Group	性别 Sex	样本数(份) Sample size	阳性数(份) Positive size	阳性率(%) Positive rate
野生群 Wild group	♀	130	0	0 (0/130)
	♂	70	0	0 (0/70)
子一代 First filial generation	♀	24	0	0 (0/24)
	♂	48	0	0 (0/48)
合 计 Total	♀	154	0	0 (0/154)
	♂	118	0	0 (0/118)

2.4 小 结

我们对中缅树鼩中 6 个易感病毒进行了血清学调查(表 8)。结果表明：272 份中缅树鼩血清样本 HBV、HCV 和 HEV 检测均为阴性。树鼩血清样本 ELISA 初筛曾检出 HBsAg 阳性样本 3 份, 但进一步对该 3 份阳性样本进行的乙肝两对半检测发现 5 项指标均为阴性, 仅 1 份野生群样本的 HBsAb 的量高于正常范围。因此, 我们认为在利用树鼩作为肝炎动物模型时, 仅仅 ELISA 筛查 HBsAg 是不够的, 需要辅以病毒核酸指标检测。随着近年来越来越多的国内外学者在树鼩作为肝炎病毒感染模型方面的探索实验, 树鼩是否会有自发肝炎感染, 是否有树鼩肝炎的存在及其带毒状况必将成为研究者的一个重要探索方向。由于缺乏树鼩的实验试剂, 一般研究所使用的乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒总抗体和戊型肝炎病毒 IgG 抗体检测试剂均为人源性病毒检测试剂盒, 人和树鼩的抗体之间有可能无或只有弱的交叉反应性, 导致灵敏性较差。

中缅树鼩野生群中存在着 HSV-2 病毒感染, 这个结果和前人的报道基本一致(Darai & Matz, 1979; Mirkovic et al, 1970)。试验中可根据所建感染性疾病动物模型需要选择性筛查 HSV。同时由于 HSV 感染率较高, 建议在建立树鼩繁殖群时应进行 HSV

表 8 中缅树鼩 6 种病毒自然感染检测结果汇总表

Tab. 8 Summary of sero-epidemiology of six viruses infection in *Tupaia belangeri*

病 毒 Virus	样本数 (份) Sample size		阳性数 (份) Positive size		阳性率 (%) Positive rate		合 计 Total	
	野生群 Wild group	子一代 First filial generation	野生群 Wild group	子一代 First filial generation	野生群 Wild group	子一代 First filial generation	阳性数(份) Positive size	阳性率 (%) Positive rate
HBV	200	72	0	0	0 (0/200)	0 (0/72)	0	0 (0/272)
HCV	108	72	0	0	0 (0/108)	0 (0/72)	0	0 (0/180)
HEV	108	72	0	0	0 (0/108)	0 (0/72)	0	0 (0/180)
HSV-1	200	72	0	0	0 (0/200)	0 (0/72)	0	0 (0/272)
HSV-2	200	72	1	0	0.50 (1/200)	0 (0/72)	1	0.37 (1/272)
ADV	200	72	0	0	0 (0/200)	0 (0/72)	0	0 (0/272)

筛查。

鉴于目前树鼩研究尚处于起步阶段, 无商品化的树鼩病毒检测试剂, 本次筛查试验中均采用的是人源试剂盒, 根据已有的树鼩感染病毒报道 (Mirkovic et al, 1970; Wu et al, 1990), 树鼩自发感染的病毒与人源病毒有一定差异, 因此深入研究树鼩自发感染病毒, 据此开发树鼩病毒检测试剂盒是树鼩实验动物化的一个重要内容。

通过检测 6 个已知易感病毒在野生群和子一代中缅树鼩中的自然感染情况, 了解它们在中缅树鼩中的流行情况, 为云南产中缅树鼩实验动物标准化提供了参考, 为进一步建立更加完善和理想的树鼩感染性疾病动物模型研究奠定了基础。

致谢: 感谢中国科学院昆明动物研究所实验动物中心和中国科学院昆明灵长类研究中心工作人员协助采集树鼩样本和昆明医学院第一附属医院检验科工作人员进行 HBV 的定性和定量检测。

参考文献:

Amako Y, Tsukiyama KK, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. 2010. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. *J Virol*, **84**(1): 303-11.

Ben KL. 1997. The Essentiality of Tree Shrews Application and Experimental Animalization in Biomedicine Research [C]//The Proceedings of Yunnan Strain Animals & Plants Industry and Market Developing Seminar, Kunming, Yunnan Science & Technology Press, 78-80. [贲昆龙. 1997. 树鼩在生物医学研究中的应用及其实验动物化的必要性 [C]//云南省特种动植物产业与市场发展研讨会论文集, 昆明, 云南科技出版社, 78-80.]

Breum SO, Hjulsager CK, Deus N, Segales J, Larsen LE. 2010. Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population [J]. *Vet Microbiol*, **146**: 144-149.

Chen J, Dai JJ, Sun XM. 2008. The progress of tree shrew as animal models for hepatitis research [J].*Chin J Comp Med*, **18**(2): 59-62. [陈瑾, 代解杰,孙晓梅. 2008. 树鼩肝炎动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, **18**(2): 59-62.]

Chen LL, Shen PQ, Liu RW, Jiao JL, He BL. 2009. Several commonly used blood collection methods for tree shrews in experiments [J]. *J Region Anat Oper Surg*, **18**(4): 223-224. [陈丽玲, 沈培清, 刘汝文, 角建林, 何保丽. 2009. 树鼩实验中几种常用的采血方法 [J]. 局解手术学杂志, **18**(4): 223-224.]

Chen YD, Dai GZ, Li J, Xu WM, Sun MS, Ding XF, Wang LC, Su Y, Du DP. 1987. Study on adenoviruses in tree shrew Stools [J]. *Chin J Zoonoses*, **3**(3): 2-4. [陈元鼎, 戴国珍, 李军, 徐维明, 孙茂胜, 丁雪凤, 王丽春, 苏晔, 杜丹萍. 1987. 树鼩大便中腺病毒的实验研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, **3**(3): 2-4.]

Darai G, Matz B. 1979. Characterization of a tree shrew herpesvirus isolated from a Lamphosarcoma [J]. *J Gen Virol*, **43**: 541-551.

Kabrane LY, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A, Gibbs CJ Jr, Meng XJ, Emerson SU, Purcell RH. 1999. Evidence for wide-spread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States [J]. *Am J Trop Med Hyg*, **61**: 331-335.

Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. 1994. Demonstration of *in vitro* in fection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specitic RT-PCR [J]. *Virol*, **202**: 606-614.

Li G, Yan Y, Chang YY, Lü LB. 2009. New method of the tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) breeding in laboratory [J]. *Mod J Am Vet Med*, **3**: 18-21. [李贵, 严晔, 常云艳, 吕龙宝. 2009. 树鼩实验室繁殖的新方法 [J]. 现代畜牧兽医, **3**: 18-21.]

Li QF, Ding MQ, Wang H, Mao Q, Wu CQ, Zheng H, Gu CH, Wang YM. 1995. *In vivo* infection of tree shrew with human hepatitis D virus [J]. *Chin Med J*, **75**(10): 611-613. [李奇芬, 丁明权, 王洪, 毛青, 吴纯清, 郑红, 顾长海, 王宇明. 1995. 树鼩感染丁型肝炎病毒的实验研究 [J]. 中华医学杂志, **75**(10): 611-613.]

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, James RL, Dale MW, Tatiana ST, Joseph SH, Brad JT, Suzanne UE. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 9860-9865.

Mirkovic R, Voss WR. Benyesh-Melnick M. 1970. Characterization of a new herpes-type virus indigenous for tree shrews [C]// Proc 10th International Congress of Microbiology, Mexico City, 181-189.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ. 1991. Biology of Tree Shrew [M]. Kunming, Yunnan Science & Technology Press, 1-422. [彭燕章, 叶智彰, 邹如金. 1991. 树鼩生物学 [M]. 昆明, 云南科学技术出版社, 1-422.]

Sun XM, Ye YS, Han YY, Huang ZQ, Dai JJ. 2009. Basic experimental techniques in tree shrews [J]. *Chin J Comp Med*, **19**(12): 76-78. [孙晓梅, 叶尤松, 罕园园, 黄璋琼, 代解杰. 2009. 树鼩的基本实验操作方法 [J]. 中国比较医学杂志, **19**(12): 76-78.]

Wang Q, Li Y. 2010. The progress of HBV and HCV infect tree shrew *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Guangxi Med Univ*, **27**(1): 155-158. [王琦, 李瑗. 2010. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染树鼩的体内外模型研究进展[J]. 广西医科大学学报, **27**(1): 155-158.]

Wu XX, Tang EH, Zhang XS, Xu WM, Xie GZ, Wen YL, Liu MY. 1990. Biological characteristics, relationship between antigen and serology of Tupaial adenoviruses (type Ⅰ and Ⅱ) [J]. *Acta Acad Med Sin*, **12**(2): 153-156. [吴小闲, 唐恩华, 张新生, 徐维明, 谢广珍, 文喻玲, 刘名英. 1990. 树鼩腺病毒(I 和 II 型)的生物学性状、抗原关系和血清抗体的研究 [J]. 中国医学科学院学报, **12**(2): 153-156.]

Yang EB, Cao J, Su JJ, Chow P. 2005. The tree shrews: useful animal models for the viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatogastroenterol*, **52**(62): 613-616.

Zhang L, Ben KL. 2001. *In vitro* infection of tree shrew immunocytes with human immunodeficiency virus type Ⅰ [J]. *Zool Res*, **22**(1): 33-40. [张立, 贲昆龙. 2001. 树鼩免疫细胞体外感染Ⅰ型人免疫缺陷病毒的实验研究[J]. 动物学研究, **22**(1): 33-40.]

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 17−23 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01017

Genetic diversity and matrilineal structure in Chinese tree shrews inhabiting Kunming, China

BACK

CHEN Shi-Yi [1], XU Ling [1,3], LÜ Long-Bao [2], YAO Yong-Gang [1,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, *Kunming Yunnan* 650223, *China*; 2. *Experimental Animal Core Facility & Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China*; 3. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Due to their special phylogenetic position in the Euarchontoglires and close affinity to primates, tree shrews have been proposed as an alternative experimental animal to primates in biomedical research. However, the population genetic structure of tree shrews has largely remained unknown and this has hindered the development of tree shrew breeding and selection. Here we sampled 80 Chinese tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) in Kunming, China, and analyzed partial mtDNA control region sequence variation. Based on our samples and two published sequences from northern tree shrews (*T. belangeri*), we identified 29 substitutions in the mtDNA control region fragment (~ 604 bp) across 82 individuals and defined 13 haplotypes. Seventeen samples were selected for sequencing of the cytochrome *b* (Cyt *b*; 1134 bp) gene based on control region sequence variation and were analyzed in combination with 34 published sequences to solidify the phylogenetic pattern obtained from control region data. Overall, tree shrews from Kunming have high genetic diversity and present a remarkable long genetic distance to the two reported northern tree shrews outside China. Our results provide some caution when using tree shrews to establish animal models because of this apparent genetic difference. In addition, the high genetic diversity of Chinese tree shrews inhabiting Kunming suggests that systematic genetic investigations should be conducted before establishing an inbred strain for medical and biological research.

Key words: Chinese tree shrews; mtDNA; Control region; Cytochorme *b*; Genetic diversity

昆明城郊中国树鼩群体线粒体 DNA 遗传多样性

陈仕毅 [1], 许 凌 [1,3], 吕龙宝 [2], 姚永刚 [1,*]

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;
2. 中国科学院昆明动物研究所 实验动物中心, 云南 昆明 650223; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要：由于树鼩是灵长类动物的近亲, 且具有体型小、繁殖周期短、饲养管理成本低等优点, 长期以来被认为有望替代灵长类动物用于人类疾病的动物模型研究。然而, 目前对树鼩的群体遗传结构还知之甚少, 这极大地限制了其在疾病动物模型研究的应用, 也是其品系资源创制的瓶颈。本研究通过分析 80 只采自于云南省昆明周边地区的野生树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*) 线粒体 DNA (mtDNA) 多态性, 结合国外报道的 2 个树鼩 (*Tupaia belangeri*) 序列比较后发现, 在 604 bp 的 mtDNA 控制区片段中共检测到 29 个核苷酸替代变异, 这些变异共界定了 13 种单倍型, 表现较高的群体遗传多样度。另外, 昆明地区的树鼩与国外报道的 2 个树鼩间存在较大的遗传分化, mtDNA 控制区单倍型之间的核苷酸替换数大于 18 个, 远高于昆明地区树鼩群体内部不同单倍型之间的差异。选择含有代表性的 mtDNA 控制区单倍型的 17 个昆明地区树鼩个体进一步测定了细胞色素 *b* 基因片段 (1134 bp), 结合前人报道的数据分析, 结果进一步支持 mtDNA 控制区数据反映的遗传格局及揭示的昆明地区树鼩与国外报道树鼩之间的明显差异。本研究结果提示, 昆明地区树鼩与国外树鼩之间存在较大遗传差异, 在将树鼩用于人类疾病动物模型研究中要注意这些遗传差别。昆明城郊的树鼩群体具有较高的遗传多样度, 在开展近交系建立等工作时须考虑选取群体内部具有代表性的 mtDNA 世系。

Received date: 2010-12-02; Accepted date: 2010-12-27

Foundation items: This study was supported by grants from Yunnan Province (2009CI119), the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-R-11 and KSCX2-EW-J-23) and the Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province

[*] Corresponding author (通信作者), Email: ygyaozh@gmail.com

收稿日期：2010-12-02；接受日期：2010-12-27

关键词：中国树鼩; 线粒体 DNA; 高变区; 细胞色素 *b*; 遗传多样性
中图分类号：Q959.832; Q951.3; Q347 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0017-07

Tree shrews (*Tupaia belangeri*) are small mammals of a squirrel-like appearance formerly placed in the Primates order despite a lack of derived features characteristic of primate species (Sargis, 2004). It is currently placed in the family of Tupaiidae, Scandentia, which together with Dermoptera and Primates, form the group Euarchonta (Murphy et al, 2001; Helgen, 2005). Although the exact phylogenetic position of tree shrews remains resolved, this animal is still regarded as a close relative to primates (Nie et al, 2008; Peng et al, 1991; Seiffert et al, 2003). Given that tree shrews are easy to raise, cheap to maintain, have a high reproductive rate, small body size, and close affinity to primates, this animal may be an alternative to the use of primates in biomedical research. For example, tree shrews have been used in creating animal models for hepatitis B virus and hepatitis C virus infection (Amako et al, 2010; Cao et al, 2003; Köck et al, 2001; Ren & Nassal, 2001; Su, 1987; Xu et al, 2007; Yan et al, 1996). Tree shrews were also successfully used in the study of pathogenesis of human myopia and psychosocial stress diseases (Cao et al, 2003; Fuchs, 2005; Norton et al, 2006). In addition, tree shrews have the highest brain to body ratio of all mammals, including humans (Peng et al, 1991; Previc, 2009), which raises the possibility of investigating brain function and creating animal models for human neuro-degenerative diseases.

There are four genera within the family Tupaiidae, consisting of *Tupaia*, *Anathana*, *Urogale*, and *Dendrogale* (Helgen, 2005). In genus *Tupaia*, a total of 15 species are recognized and broadly distributed across Southeast Asia including southern China, India, Philippines, Java, Borneo, Sumatra and Bali (Olson et al, 2005; Peng et al, 1991). Chinese tree shrews (*Tupaia belangeri*) are distributed across southwest China. According to geographical distribution and morphological characteristics, Wang (1987) proposed that Chinese tree shrews could be divided into six subspecies: *Tupaia belangeri chinensis* distributed in most of parts of Yunnan, Yun-Gui plateau, and southwest Sichuan; *T. b. gaoligongensis* distributed in central and north Gaoligong Mountain; *T. b. modesta* on Hainan Island; *T. b. tonquinia* distributed in southwest Guangxi; *T. b. yaoshanensis* distributed in northwest Guangxi; and *T. b. yunalis* distributed in central and south Yunnan, northwest Guangxi and southwest Guizhou. Recently, Jia et al (2009) studied the morphometrics of the skull and mandible of *T. b. chinensis* collected in Luquan, Jianchuan, Lijiang, and Yunlong Counties of Yunnan and morphological differences between localities. In combination these studies suggest that Chinese tree shrews show regional differentiation.

Despite growing attention and the strong potential of tree shrews as an animal model for human disease, scant biological data about these species have been collected, especially at the molecular level (Peng et al, 1991). This deficit has constrained the utilization of tree shrews as an animal model in biomedical studies. Although the critical problem regarding laboratory breeding and domestication of wild tree shrews was solved more than two decades ago (Peng et al, 1991), an inbred strain of tree shrews has not been established because, among other factors, of a lack of genetic data.

Here we aimed to analyze the genetic structure of tree shrews collected from urban Kunming, Yunnan, China to provide useful information to establish several inbreeding lines from these captured animals. We used mitochondrial DNA (mtDNA) as a genetic marker as it is useful in revealing the origin and demographic history and overall genetic diversity of domestic and wild species (He et al, 2008).

1 Materials and Methods

1.1 Sampling, DNA amplification and sequencing

We collected ear or muscle tissue from 80 Chinese tree shrews (*T. b. chinensis*) inhabiting the suburb of Kunming, Yunnan, China. Animals were raised at the experimental animal core facility of the Kunming Institute of Zoology and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences.

Genomic DNA was extracted from tissue samples using the standard phenol/chloroform method. A fragment with a size of 1 488 bp that covers the entire mtDNA control region of Chinese tree shrews was amplified using primer pairs L15356: 5'-CTCAAGGAA GAAGAACAATA-3' / H50: 5'-TGTATGTTTATGGAG TCTATG-3'. Primers were named relative to their

positions in the complete mtDNA sequence of northern tree shrew (GenBank accession number NC_002521). PCR amplification was performed in a volume of 50 µL reaction mixture containing 100 ng of DNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 50 mmol/L KCl, 10 pmol/L of each primer, and one unit of LA Taq polymerase (Takara, Dalian, China) following 35 cycles of 50 s at 94°C, 50 s at 55°C and 60 s at 72°C. The complete mitochondrial Cyt *b* gene was amplified and sequenced in 17 Chinese tree shrews representing different haplotypes as identified by mtDNA control region data. We used primer pair L14058: 5'-ACAAAAACACAATATAAGGCA -3' / H15298: 5'-CTCCGTTTCTGGTTTACAAG -3' to amplify the Cyt *b* gene, applying the same amplification conditions and procedures as used for mtDNA control region. PCR products were purified on spin columns and directly sequenced using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) on an ABI 3730 DNA sequencer according to the manufacturer's manual. Two inner sequencing primers (H16093: 5'-CAAGTTAAGTCCAGCTACAAT-3', for mtDNA control region; L15059: 5'-TCCCATTCCTT CACACGTC-3', for Cyt *b* gene) and primers L15356, L14058, and H15298 were used for overlapping sequencing of the analyzed region. The mtDNA sequences of Chinese tree shrew have been deposited in GenBank with accession numbers HQ836245- HQ836324 (for mtDNA control region sequences) and HQ836325-HQ836341 (for Cyt *b* gene sequences).

1.2 Data Analysis

We analyzed a fragment of mtDNA control region (~604 bp) in 80 Chinese tree shrews, corresponding to 15416th–16017th region in mitochondrial genome of *T. belangeri* (GenBank accession number NC_002521). Two reported individuals of northern tree shrews (*Tupaia belangeri*) outside China were retrieved from GenBank and were aligned with those of Chinese tree shrews (Tab. 1 and Fig. 1). Sequence variations were exported using Mega 4.0 (Tamura et al, 2007). The available Cyt *b* gene sequences of tree shrews in GenBank, including 32 Chinese tree shrews and two northern tree shrews outside China (Tab. 1), were also analyzed together with 17 newly sequenced samples. Relationships among the lineages were explored using the median-joining networks (Bandelt et al, 1999). Networks were constructed manually and were checked using Network 4.1 (http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm), in which transitions and transversions were equally weighted. Nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (*h*) were estimated according to Nei (1987) and using DnaSP 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

To further determine the phylogenetic position of Chinese tree shrews we retrieved the Cyt *b* gene sequences of *Tupaia glis* (AY321645), *T. longipes* (AY321651), *T. salatana* (AY321654), and *Dendrogale melanura* (AY321634, as the outgroup) from GenBank and constructed a neighbor-joining (NJ) tree using Mega 4.0 (Tamura et al, 2007). The maximum composite likelihood nucleotide substitution model was employed. The rate variation among sites, with four rate categories for the nucleotide gamma shape parameter, was

Tab. 1 mtDNA sequence information for tree shrews analyzed in this study

Species	GenBank accession number	No.	h [a]	π [a]	References
Control region					
Chinese tree shrews	HQ836245- HQ836324	80	0.790 ± 0.032	0.00436 ± 0.00017	This study
Northern tree shrews outside China	AF217811[b]	1	—	—	Schmitz et al, 2000
	AJ421453	1	—	—	
Cyt *b* gene					
Chinese tree shrews	HQ836325- HQ836341	17	0.926 ± 0.035	0.00338 ± 0.00029	This study
	AY321635-AY321637	3			From GenBank
	EU376531, EU531749-EU531776	29			Jia et al, 2008
Northern tree shrews outside China	AF217811 [b]	1	—	—	
	AJ421453	1	—	—	

[a] Nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (*h*) were estimated according to Nei (1987) . We pooled all Cyt *b* sequences of Chinese tree shrews together to estimate these two parameters.

[b] This sequence has been curated by NCBI staff and has the accession number NC_002521.

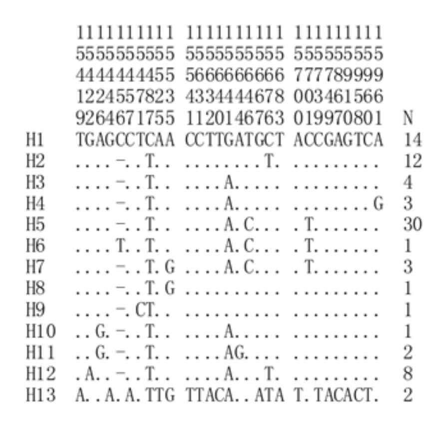


Fig. 1 Sequence variation of mtDNA control region fragments (~604 bp) of 80 Chinese tree shrews and two reported northern tree shrews outside China

The number of individuals sharing the same haplotype are listed in the right column, under N. Dots (·) denotes identical sites. The numbering of each position was based on the mitochondrial genome of the tree shrew (GenBank accession number NC_002521).

estimated using jModelTest 0.1.1 (Guindon & Gascuel, 2003) which finally yielded the alpha value 0.64.

2 Results

2.1 Sequence variation and haplotype distribution

The mtDNA control region sequences of tree shrews presented length mutations, which were caused by insertion/deletion (indels) of tandem repeat or length mutations of a stretch of duplicated nucleotide in region 15449–15456. One sample (TS07) had an extra insertion of CATT repeat in region 15557–15564 which contained two tandem repeats in the analyzed fragment (~604 bp). After the indels were excluded, we found 29 sequence variations in the analyzed fragment of mtDNA control region, which defined 13 haplotypes (H1–H13; Fig. 1). Among them, haplotype H5 was dominant and occurred in 30 individuals, followed by haplotypes H1 (in 14 individuals), H2 (in 12 individuals) and H12 (in 8 individuals). The other haplotypes had a low frequency and were shared by no more than four samples. The two reported northern tree shrews outside China shared haplotype H13, and presented strong differences to the haplotypes identified in Chinese tree shrews (Fig. 1). The overall genetic diversity of 80 Chinese tree shrews (π = 0.00436 ± 0.00017 and h = 0.790±0.032) was relatively high.

One hundred and twelve variable sites were found in 51 Cyt *b* gene sequences (including 49 Chinese tree shrews and the two northern tree shrews outside China), which defined 26 haplotypes (h1–h26). Among these sequence variations, 17 substitutions caused amino acids changes. Some representative samples bearing different mtDNA control region haplotypes, e.g. H5 and H7, were found to share identical Cyt *b* sequence of h4. However, the two randomly selected individuals sharing mtDNA control region haplotype H5 differed from each other by one substitution in the Cyt *b* sequences (h4 and h5). Samples bearing unique mtDNA control region haplotypes (H1, H2, H3, H8, H9, H12, and H13) also differed from each other by some nucleotide substitutions in the Cyt *b* gene. Remarkably, the two northern tree shrews outside China shared the same Cyt *b* sequence and presented at least 89 mutation distances to Chinese tree shrews (Fig. 2). The nucleotide diversity of 49 Chinese tree shrew Cyt *b* gene sequences was 0.00333 ± 0.00032.

2.2 Network profiles of mtDNA haplotypes in Chinese tree shrews

Fig. 3a shows the network file of mtDNA control region haplotypes in 82 tree shrews analyzed in this study. The network of all Chinese tree shrews followed a roughly star-like pattern, with haplotype H3 residing in the central location and being the nodal type. However, the frequency (5%, 4/80) of H3 was quite low in our samples. All other haplotypes differed from H3 by no more than a 3-mutation distance, suggesting relatively recent divergence. The three dominant haplotypes (H1, H2, and H5) were distributed at the terminal branches of the network. Up to 18-mutation distance existed between Chinese tree shrews (haplotypes H1-H12) and the reported northern tree shrews outside China (haplotype H13).

The network profile of the Cyt *b* haplotypes followed a similar pattern observed for mtDNA control region sequences (Fig. 3b). Because we selected the samples for Cyt *b* sequencing based on the haplotypes identified by control region sequence information, an estimation of the frequency of each Cyt *b* haplotype may be biased, despite a fact that we took 32 published Chinese tree shrews samples into consideration. Nonetheless, the phylogenetic relationship as indicated by the network of Cyt *b* haplotypes might offer further information for us to discern the genetic difference between different lineages. Consistent with the pattern of mtDNA control region sequence data, haplotype h3 was also located in the central location of the network, suggesting its ancestral status. The difference of Cyt *b* gene nucleotide changes between Chinese tree shrews and the reported northern tree shrews (h26) was

```
     1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 11
     4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444555555 5555555555 5555555555 55
     1111112222 2222233333 3334444444 4445555555 5556666666 6667777777 7777788888 8888888999 9999000000 0001111111 1112222222 22
     3666990233 3448800045 6771334555 7892244577 7890123345 7790112233 4555711233 3346679003 3456122334 5590123455 6890011234 45
     4069368024 9573647832 4168342147 2546714645 7654681795 3910582403 7145848412 3950518174 7381517038 1760102738 8068903510 42
h1   AAGCCACAGC TGGACCTGGC GCCCGTTTGT TTGATAGGTT ACCCGTAACT TTCATCTATC ACATTCCACC AGCTCGTATT AATGCCCCAT AAATCTGCGT GTAGCCTTTC TC  3 (H1)
h2   .......... .......A.. .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. ........GC .......... .......... ..  2 (H2)
h3   .......... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  9 (H3)
h4   .......... .........T .T........ .......... ....A..... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  2 (H5/H7)
h5   .......... .........T .T..A..... .......... ....A..... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  1 (H5)
h6   .......... .......... .T........ .......... ....A..... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......C.. ..  1 (H8)
h7   .......... .A........ .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  1 (H9)
h8   .......... ...G...... .T........ .......... .......... .......... .......... .....A..C. .......... ..G....... .......... ..  5 (H10)
h9   .......... .......... .T........ .C........ .......... .......... .......... ........C. .........C .......... .......... ..  2 (H12)
h10  .......... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G......C .......... ..  2
h11  .......... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... .A......C. .......... ..G....... .......... ..  1
h12  .......... .......... .T........ .......... .......... C......... .......... ........C. .......... ..G..A.... .......... ..  1
h13  .......... .......... .T........ .......... ...T...... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  5
h14  .......... .......... .T........ C......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G......C .......... ..  1
h15  .......... .........T .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G..A.... .......... ..  1
h16  .......... .........T .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G..A.... ...A...... ..  1
h17  .......... .........T .T..A..... .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G..A.... .......... ..  3
h18  .......... ...G...... .T........ .......... .......... .......... .......... .....A..C. .......... ..G....... .C........ ..  1
h19  .......... ..A....... .T........ .......... .......... .......... .......... .....AC.C. .......... ..G..C.... .......CC. ..  1
h20  .......... ..A......T .T........ .......... ....A..... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  1
h21  .......... ..A......T .T........ .A........ ....A..... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... ..  1
h22  .......... .A........ .T........ .......... .......... ...G...... .......... ........C. .......... ..G....... .C........ ..  1
h23  ....A..... .......... .T........ .......... .......... .......... .......... ........C. .......... ..G....... .......... A.  1
h24  ....A....T .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....G..... ..  1
h25  .T........ .........T .T........ .......... ....A..... .......... .......... ........C. .......... ..G....... ...A...... A.  1
h26  G.AT.GTGA. CA..TTCAAT ATTT.CCCAC ..AGCGATCC GAT.ACCGTC CCT.CTCTCT GTTCCTTGTT C.TCTC.GCC GGCATTTTGC TG.CT.ATA. ACG..ACAAT .T  2 (H13)
```

Fig. 2 Sequence variation of mtDNA cytochrome *b* gene fragments (1134 bp) of 17 Chinese tree shrews newly sequenced in this study and 34 individuals from GenBank

The detailed sources of these reported sequences are listed in Tab. 1. Dots (·) denotes identical sites. Substitutions were numbered according to the mitochondrial genome of northern tree shrew (GenBank accession number NC_002521). The number of individuals sharing certain mtDNA control region haplotypes (in parentheses) is listed in the right column.

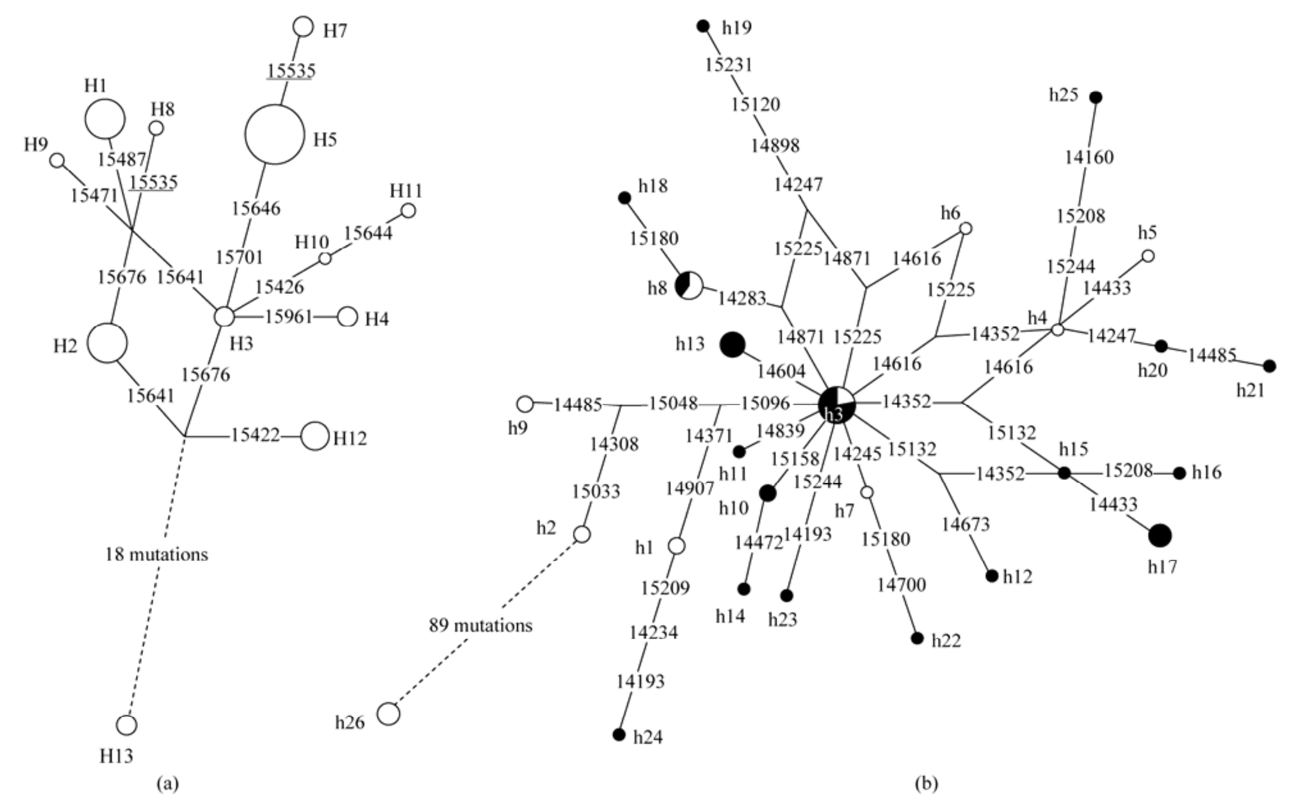


Fig. 3 Network profiles of the mtDNA control region (a) and Cyt *b* gene (b) haplotypes of tree shrews

The links are labeled by nucleotide positions to designate variations. The order of the mutations on a branch is arbitrary. The area of each circle is proportional to haplotype frequency. White color denotes individuals analyzed for both mtDNA control region and Cyt *b* gene sequence variation. Chinese tree shrew Cyt *b* gene sequences from GenBank are marked black.

remarkable, with a ratio (89/1134) even higher than that of the mtDNA control region (18/604).

2.3 Phylogenetic position of Chinese tree shrews

We constructed an NJ tree of the 26 Cyt *b* haplotypes of Chinese tree shrews, together with four species from GenBank (*Tupaia glis*, *Tupaia longipes*, *Tupaia salatana*, and *Dendrogale melanura*), to further demonstrate the affinity of Chinese tree shrews to other species (Fig. 4). All Chinese tree shrews haplotypes were clustered together with high bootstrap support. Chinese tree shrews are clearly separated from northern tree shrews outside China and other species, but presented an overall closer relationship to northern tree shrews.

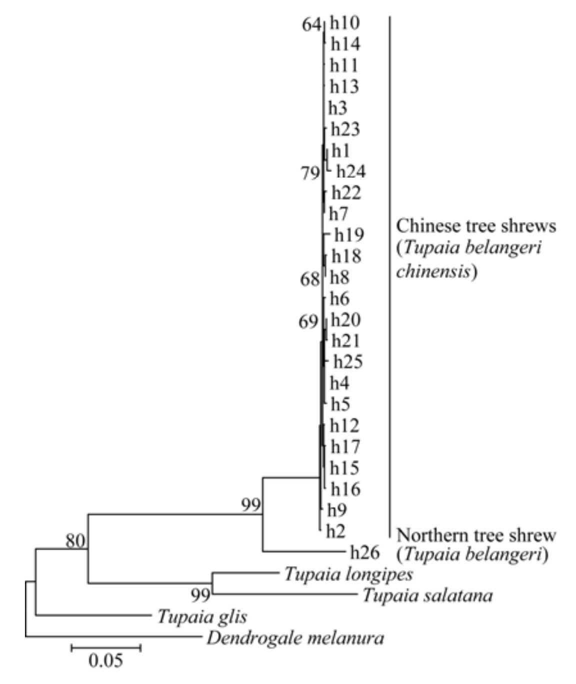


Fig. 4 The neighbor-joining (NJ) tree of the Cyt *b* gene of 26 *Tupaia belangeri* haplotypes and four other species (*T. glis*, *T. longipes*, *T. salatana*, and *Dendrogale melanura*)

Tree was rooted by *Dendrogale melanura*. The values on the branch are bootstrap support based on 1000 replications and values lower than 50% were omitted.

3 Discussion

Tree shrews are received more and more attention due to their potential use as animal models for human disease and as alternatives for primates in biomedical research (Cao et al, 2003; Peng et al, 1991). Although the exact phylogenetic position of tree shrews within the Euarchontoglires remains of debate (Arnason et al, 2002; Murphy et al, 2001; Nie et al, 2008; Olson et al, 2005; Peng et al, 1991; Sargis, 2004; Schmitz et al, 2000), available evidence has undoubtedly suggested a closer affinity of tree shrews to well-known primates such as rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and crab-eating macaques (*Macaca fascicularis*) than mice or rats. Given that tree shrews are also small animals and easy to raise, it may be promising to develop them as replacements for monkeys and other endangered non-human primate species.

There are 15 recognized species and 40 subspecies in genus *Tupaia* (http://www.bucknell.edu/msw3/; Helgen, 2005). However, to our knowledge an insufficient number of molecular studies have been done and necessary information for biomedical research and breeding as an experimental animal remain unknown. Work on gene expression in the hippocampal tissue of tree shrews treated with cortisol (Alfonso et al, 2004) and proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis (Li et al, 2008) has yielded useful information, but compared to the available knowledge for mice and rats there is still much unknown about these animals.

Here we focused on mtDNA sequence variation in Chinese tree shrews captured from urban Kunming. Our initial aim was to better understand the genetic structure of this species and to establish a matrilineal marker for tracing lineages in a subsequent tree shrews breeding project. In addition, we wanted to better understand overall genetic diversity of this animal resource. By comparing the mtDNA sequence differences between Chinese tree shrews and northern tree shrews, we found that they had a large divergence (Figs.1, 2). Network analyses showed that Chinese tree shrews and northern tree shrews are clearly separated from each other (Fig. 3). Our results raise caution over the routine use of tree shrews as animal models and genetic differences are ignored, especially when studies simply named their subjects as *Tupaia belangeri*.

The divergence of Chinese tree shrews and northern tree shrews was unexpected and implies that a systematic analysis of the six proposed subspecies of Chinese tree shrew (Wang, 1987) requires verification in future studies. Moreover, capturing and domesticating wild animals with the representative lineages should be encouraged during our efforts in establishing inbred tree shrew strains for medical and biological research. The observation that the tree shrew population inhabiting Kunming has a considerably high mtDNA genetic diversity is consistent with the result of a recent study of

microsatellite markers in which He et al (2009) found that nine out of 11 loci exhibited polymorphisms in 30 Chinese tree shrews. Data such as that presented here will be helpful in selecting founding individuals for the establishment of an inbred strain of Chinese tree shrews.

Acknowledgement: We thank YANG Zhao-Qing for collecting some tree shrews samples and JIANG Xue-Long for comments on an early version of the manuscript.

References:

Alfonso J, Aguero F, Sanchez DO, Flugge G, Fuchs E, Frasch AC, Pollevick GD. 2004. Gene expression analysis in the hippocampal formation of tree shrews chronically treated with cortisol [J]. *J Neurosci Res*, **78**(5): 702-710.

Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. 2010. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. *J Virol*, **84**(1): 303-311.

Arnason U, Adegoke JA, Bodin K, Born EW, Esa YB, Gullberg A, Nilsson M, Short RV, Xu XF, Janke A. 2002. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(12): 8151-8156.

Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, **16**(1): 37-48.

Cao J, Yang EB, Su JJ, Li Y, Chow P. 2003. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. *J Med Primatol*, **32**(3): 123-130.

Fuchs E. 2005. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder [J]. *CNS Spectr*, **10**(3): 182-190.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood [J]. *Syst Biol*, **52**(5): 696-704.

He BL, Shen PQ, Chen LL, Jia JL, Liu RW, Li B, Zheng H, Li ML. 2009. Polymorphism microsatellites in tree shrews (*Tupaia Belangeri Chinensis*) [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, **17**(2): 143-145. (in Chinese)

He DQ, Zhu Q, Chen SY, Wang HY, Liu YP, Yao YG. 2008. A homogenous nature of native Chinese duck matrilineal pool [J]. *BMC Evol Biol*, **8**: 298.

Helgen KM. 2005. Order Scandentia[M]// Wilson DE, Reeder DM (ed). 2005. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed. Maryland: Johns Hopkins University Press, 104-109.

Jia T, Lin AQ, Wang R, Zhu WL, Xiao CH, Liu CY, Meng LH, Lian X, Wang ZK. 2009. Pilot study of *Tupaia belangeri* from Yunnan Province based on morphometrics of the skulls and mandibles [J]. *Acta Theriol Sin*, **29**(3): 259-268. (in Chinese)

Jia T, Yang XM, Li ZH, Zhu WL, Xiao CH, Liu CY, Wang ZK. 2008. Classified significance of *Tupaia belangeri* from Luquan District, Kunming based on Cyt *b* gene sequences [J]. *Chn J Zool*, **43**(4): 26-33. (in Chinese)

Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsäcker F. 2001. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus [J]. *J Virol*, **75**(11): 5084-5089.

Li Y, Qin X, Cui J, Dai Z, Kang X, Yue H, Zhang Y, Su J, Cao J, Ou C, Yang C, Duan X, Yue H, Liu Y. 2008. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II [J]. *Proteomics*, **8**(7): 1490-1501.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, **25**(11): 1451-1452.

Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS. 2001. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics [J]. *Science*, **294**(5550): 2348-2351.

Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press.

Nie W, Fu B, O'Brien PC, Wang J, Su W, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang F. 2008. Flying lemurs—the 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade [J]. *BMC Biol*, **6**: 18.

Norton TT, Amedo AO, Siegwart JT, Jr. 2006. Darkness causes myopia in visually experienced tree shrews [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **47**(11): 4700-4707.

Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. 2005. Intraordinal phylogenetics of treeshrews (Mammalia : Scandentia) based on evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **35**(3): 656-673.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press. (in Chinese)

Previc FH. 2009. The Dopaminergic mind in human evolution and history [M]. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi: Cambridge University Press.

Ren S, Nassal M. 2001. Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors [J]. *J Virol*, **75**(3): 1104-1116.

Sargis EJ. 2004. New views on tree shrews: the role of tupaiids in primate supraordinal relationships [J]. *Evol Anthropol*, **13**(2): 56-66.

Schmitz J, Ohme M, Zischler H. 2000. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of Scandentia to other eutherian orders [J]. *Mol Biol Evol*, **17**(9): 1334-1343.

Seiffert ER, Simons EL, Attia Y. 2003. Fossil evidence for an ancient divergence of lorises and galagos [J]. *Nature*, **422**(6930): 421-424.

Su JJ. 1987. Experimental infection of human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrews [J]. *Chn J Pathol*, **16**(2): 103-106, 122. (in Chinese)

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, **24**(8): 1596-1599.

Wang YX. 1987. Taxonomic research on Burma-Chinese tree shrew, *Tupaia belangeri* (Wagner), from Southern China [J]. *Chn J Zool*, **8**(3): 213-230. (in Chinese)

Xu X, Chen H, Cao X, Ben K. 2007. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma [J]. *J Gen Virol*, **88**: 2504-2512.

Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Gan YC, Yang C, Huang GH. 1996. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, **122**: 283-288.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 24−30 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01024

Tree shrew models: A chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory

BACK

WANG Jing[1, 2], ZHOU Qi-Xin[1], TIAN Men[1], YANG Yue-Xiong[1], XU Lin[1,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms*, *the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, *Kunming* 650223, *China*; 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Recent genome studies indicate that tree shrew is in the order or a closest sister of primates, and thus may be one of the best animals to model human diseases. In this paper, we report on a social defeat model of depression in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). Two male tree shrews were housed in a pair-cage consisting of two independent cages separated by a wire mesh partition with a door connecting the two cages. After one week adaptation, the connecting door was opened and a brief fighting occurs between the two male tree shrews and this social conflict session consisted of 1 h direct conflict (fighting) and 23 h indirect influence (e.g. smell, visual cues) per day for 21 days. The defeated tree shrew was considered the subordinate. Compared with naïve animals, subordinate tree shrews at the final week of social conflict session showed alterations in body weight, locomotion, avoidance behavior and urinary cortisol levels. Remarkably, these alterations persisted for over two weeks. We also report on a novel captive conditioning model of learning and memory in tree shrew. An automatic trapping cage was placed in a small closed room with a freely-moving tree shrew. For the first four trials, the tree shrew was not trapped when it entered the cage and ate the bait apple, but it was trapped and kept in the cage for 1 h on the fifth trial. Latency was defined as the time between release of the tree shrew and when it entered the captive cage. Latencies during the five trials indicated adaptation. A test trial 24 h later was used to measure whether the one-trial trapping during the fifth trial could form captive memory. Tree shrews showed much longer trapping latencies in the test trial than the adaptation trials. The N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801 (0.2 mg/kg, i.p.), known to prevent the formation of memory, did not affect latencies in the adaptation trails, but did block captive memory as it led to much shorter trapping latencies compared to saline treatment in the test trial. These results demonstrate a chronic social defeat model of depression and a novel one-trial captive conditioning model for learning and memory in tree shrews, which are important for mechanism studies of depression, learning, memory, and preclinical evaluation for new antidepressants.

Key words: Social defeat; Depression; Captive conditioning; Learning and memory; Tree shrew

树鼩模型：抑郁症的社会竞争失败与学习和记忆的被捕获条件反射

王 静[1,2], 周启心[1], 田 孟[1], 杨跃雄[1], 徐 林[1,*]

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要：最近基因组研究表明树鼩属于灵长类或是与灵长类亲缘关系最密切的姐妹种。因此, 树鼩可能是应用于建立人类疾病动物模型的最佳动物之一。该文报道一种抑郁症的社会竞争失败病因学树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*)模型。一对雄性树鼩被饲养在一个双笼中, 用网格把双笼隔开, 网格上有一小门。适应 1 周后, 把小门打开, 这一对树鼩产生短暂的争斗, 每天一次，连续 21 天。其中争斗失败者被称为服从者。这个过程可导致每天 1 h 的直接社交冲突和 23 h 的间接相互影响 (比如通过气味、视觉等)。与正常对照相比, 失败者在第三周也就是社交冲突的最后一周显示了体重、自主活动、躲避行为、尿液皮质醇水平等的变化, 并且这种改变可持续至少 2 周以上。此外, 还报道全新的记忆模型, 一种被捕获条件反射树鼩模型。在一个封闭的小房间中放置捕获笼, 其中挂有

Received date: 2010-12-01; Accepted date: 2010-12-22
Foundation items: This work was supported by grants KSCX2-EW-R-12 and KSCX2-EW-J-23 from the Chinese Academy of Sciences
* Corresponding author (通信作者), Email: lxu@vip.163.com
收稿日期：2010-12-01；接受日期：2010-12-22

一片苹果, 小房间中有一只自由活动的树鼩。训练的前 4 次树鼩进入捕获笼吃苹果并不触发捕获笼关闭, 但在第 5 次时触发捕获笼关闭, 并持续一小时才释放树鼩。第 1—5 次树鼩进入捕获笼的延迟时间作为适应性指标, 其中第 5 次才是作为被捕获的一次学习训练。24 h 后, 测试树鼩进入捕获笼的延迟时间作为被捕获记忆能力指标。树鼩经过第 5 次被捕获训练, 能形成很好的被捕获记忆, 因为 24 h 后的延迟时间极大地增加。在训练前腹腔注射已知能阻断记忆形成的 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 (0.2 mg/kg, 腹腔注射), 对适应指标没有显著影响, 但是极大地缩短了 24 h 后测试的延迟时间, 即阻断了被捕获记忆。这些结果表明了一种抑郁症的慢性社会竞争失败与学习和记忆的一次被捕获条件反射树鼩模型。这两种树鼩模型对抑郁症与学习和记忆的机理研究、抗抑郁症新药的临床前药效学评价具有潜在的重要意义。

关键词：社交竞争; 抑郁; 被捕获条件反射; 学习记忆; 树鼩
中图分类号：Q175; Q133 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0024-07

Tree shrews are small diurnal mammals from the tropical forests of Southeast Asia including southwest China, Burma, Indonesia, and the Philippines. There are abundant tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) populations in Yunnan, Hai nan, Tibet, and Gui zhou provinces in China (Helgen et al, 2005). Previous molecular phylogeny studies suggest that tree shrews are in the same order as primates, which include the closest relatives to human beings (Janecka et al, 2007). It is important, therefore, to establish tree shrew models for human diseases, learning and memory, as well as preclinical evaluation for new drugs.

While psychosocial stress-based models of depression have been examined for tree shrews (Holst, 1977), such studies have only examined short fighting episodes between two males. Increasing evidence indicates that chronic psychosocial stress leads to a variety of alterations in behaviors, endocrinology, physiology, and central nervous systems in the tree shrew (Fuchs & Flügge, 2002; Meyer et al, 2001; Magariños et al, 1996), and these alterations can be reversed by antidepressant treatment (Fuchs et al, 1996; van Kampen et al, 2000; Czéh et al, 2001;van der Hart et al, 2005). It is important, therefore, to establish a chronic fighting model of depression.

Conversely, however, tree shrew models of learning and memory have been rarely studied. Holeboard learning and eight arm maze tasks have been utilized in learning and memory models for tree shrews (Ohl et al, 1998; Bartolomucci et al, 2002; Takahashi et al, 2008). These models are complicated, however, due to the repeated training processes. In the present study, we report on a social defeat model of depression as indicated by depression-like behaviors as well as urine cortisol levels in subordinate (who has experienced chronic social defeat) tree shrews. Furthermore, we established a novel one-trial captive conditioning model of learning and memory in tree shrews.

1 Materials and Methods

1.1 Animals

All experiments were performed on adult male tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*, *n*=15) obtained from the breeding colony at the Animal House Center of the Kunming Institute of Zoology, Kunming, P. R. China, and weighing 120−150 g. They were housed individually in a 12h/12h dark/light cycle (light, 8:00−20:00; dark, 20:00−8:00) and thermoregulated rooms (T: 25−27℃, RH: 55%−70%) with free access to water and food. Animal care and experimental protocols were approved by the Animal Ethic Committee of Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, P. R. China.

1.2 Drugs

MK-801 (dizocilpine maleate, Sigma), a non-competitive NMDA receptor antagonist, was dissolved in saline (0.2 mg/mL) and injected intraperitoneally (i.p., 0.2 mg/kg) 30 min before the first trial of training (Vales et al, 2006).

1.3 Experimental design

1.3.1 Depression model

Tree shrews were adapted to a pair-cage (size 67 cm ×50.5 cm×65 cm, w×d×h) (Fig.1) consisting of two independent cages separated by a wire mesh partition with a small door, for one week. Control animals (Ctrl, *n*=2) remained undisturbed until behavioral tests. Four pairs of tree shrews were housed in four pair-cages, and the door was opened for 1 h per day for 21 days, during which time a brief fighting episode occurred between each pair of the tree shrews. The defeated tree shrew was called the subordinate (Sub), while the winner was called the dominate (Dom). The fighting episode consisted of when the Sub was attacked by the Dom for 1 h at an unpredictable time point between 9:00 and 18:00 by opening the door. For the remaining time of each day,

each animal was exposed to visual, auditory, and olfactory cues. Body weight was measured once at the beginning of each week. Urine was collected at the beginning of the third and fourth week twice per day at 7:30−9:00 and 17:30-19:00.

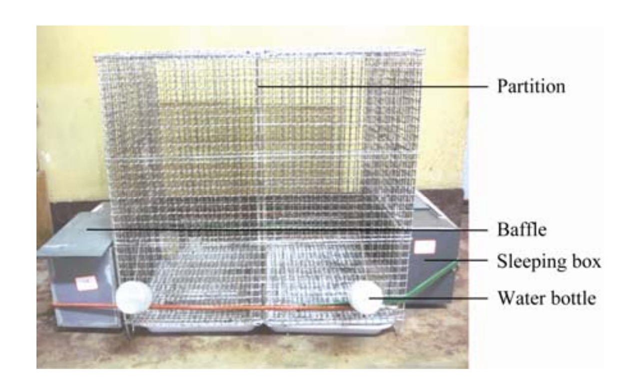


Fig. 1 Frontal view of a pair cage

1.3.2 Learning and memory model

The training/test apparatus consisted of an automatic trapping cage (size 24 cm×12.5 cm×10 cm, w×d×h) with a hook at the end on which was placed a small piece of apple (about 2−3 g). When a tree shrew ate the apple, it triggered the door to close.

Five naive tree shrews were divided into a saline group (n=2) and a MK-801 group (n=3). Tree shrews were fasted with free access to water for 24 h before training. The tree shrews were then weighed and injected with saline or MK-801. Thirty minutes later, they were placed into a small closed room with white noise (60 dB) and 55 lux illumination (Fig. 2A), and trained to find the apple in the trapping cage. During the first four training trials, the tree shrews ate the apple without triggering the door. During the fifth training trial, however, the trapping process was set and the door closed when the apple was eaten. Imprisonment lasted 1 h, after which the animals were returned to their home cage. Latency in the five training trials from release to catching the apple was used to measure adaptation. The latency on day 2 (24 h later) was used to test whether the animals had formed a captive memory (Fig. 2B), and this test trial was terminated if the animal did not catch the bait within 30 min, indicating that the animal had formed a fear memory related to being trapped. Each animal had an individual trapping cage that was placed on a new piece of black plastic so that the contrast of apple and floor was apparent. Additionally, alcohol was sprayed in the room after each trial. As a reward, animals were fed half a banana and some melon seeds after the training and tests.

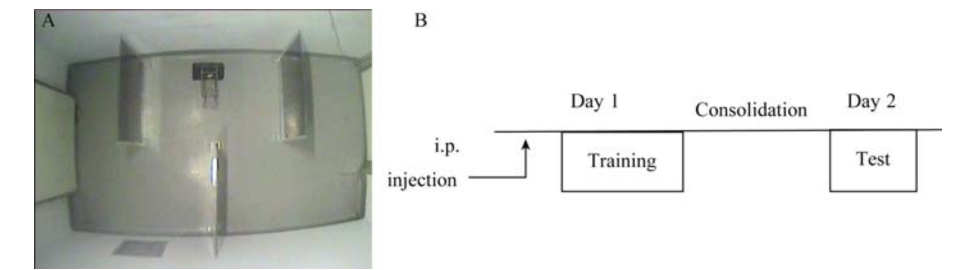


Fig. 2 Experimental design and aerial view of the tree shrews environment

A: Aerial view of environment for tree shrews. There were three black clapboards and a trapping cage in a small closed room. Black plastic was placed under the cage as a visual contrast. In the small cage, a piece of apple about 2~3 g was placed on a hook as bait. B: Experimental design. The training trials included accommodation and trapping processes.

1.4 Behavioral analysis

During the depression experiment, all animals were videotaped twice a day between 8:00−10:00 and 17:00−20:00, when their self-grooming behaviors (licking, cleaning, scratching, and washing), locomotor activities (jumping and moving in their home cage), and avoidance behavior (time spent in the sleeping-box) were measured manually from the videos. In the learning and memory experiment, performance was videotaped from 17:00 to 20:00 to avoid any unwanted confounding factors, such as human activity around the animals.

1.5 Analysis of urine samples

Urine free cortisol was measured with an Iodine [^{125}I] cortisol radioimmunoassay kit (Bei Jing North Institute of Biological Technology, China) and γ radio-immunity counter (GC-2010, Zonkia, Anhui, China). To distinguish radioimmunoassay and immunoradiometric assay, the results were determined with a log-logit process mode.

1.6 Data analysis and statistics

Data was statistically analyzed using SPSS 16.0. Cortisol and behavioral data of each animal for each day was averaged and a statistic method one-way ANOVA was used. The significance level was set at P<0.05. Data is expressed as mean±*SEM*.

2 Results

2.1 Depression model

Compared with naive animals, subordinate tree shrews (Sub group, n=4) showed a significant decrease in the number of self-grooming [$F_{(1, 4)}$=7.864, P=0.049; $F_{(1, 4)}$=12.180, P=0.025; Fig. 3A] and locomotion [$F_{(1, 4)}$ =15.840, P=0.016, Fig. 3B] activities between their cages and sleeping-boxes [$F_{(1, 4)}$=18.190, P=0.013; $F_{(1, 4)}$ =17.747, P=0.014; Fig.3C,D] in the final week of 21 days of social conflict. Conversely, the time spent in the sleeping-box by the Subs showed a significant increase by the third week [$F_{(1, 4)}$ =14.644, P=0.019; Fig. 3E]. The difference activity between Sub and control group (Ctrl) was significant in the afternoon, especially from 18:30 to 19:30, the activity peak period in tree shrews [$F_{(1, 4)}$ =216.000, P=0.000; Fig. 3F].

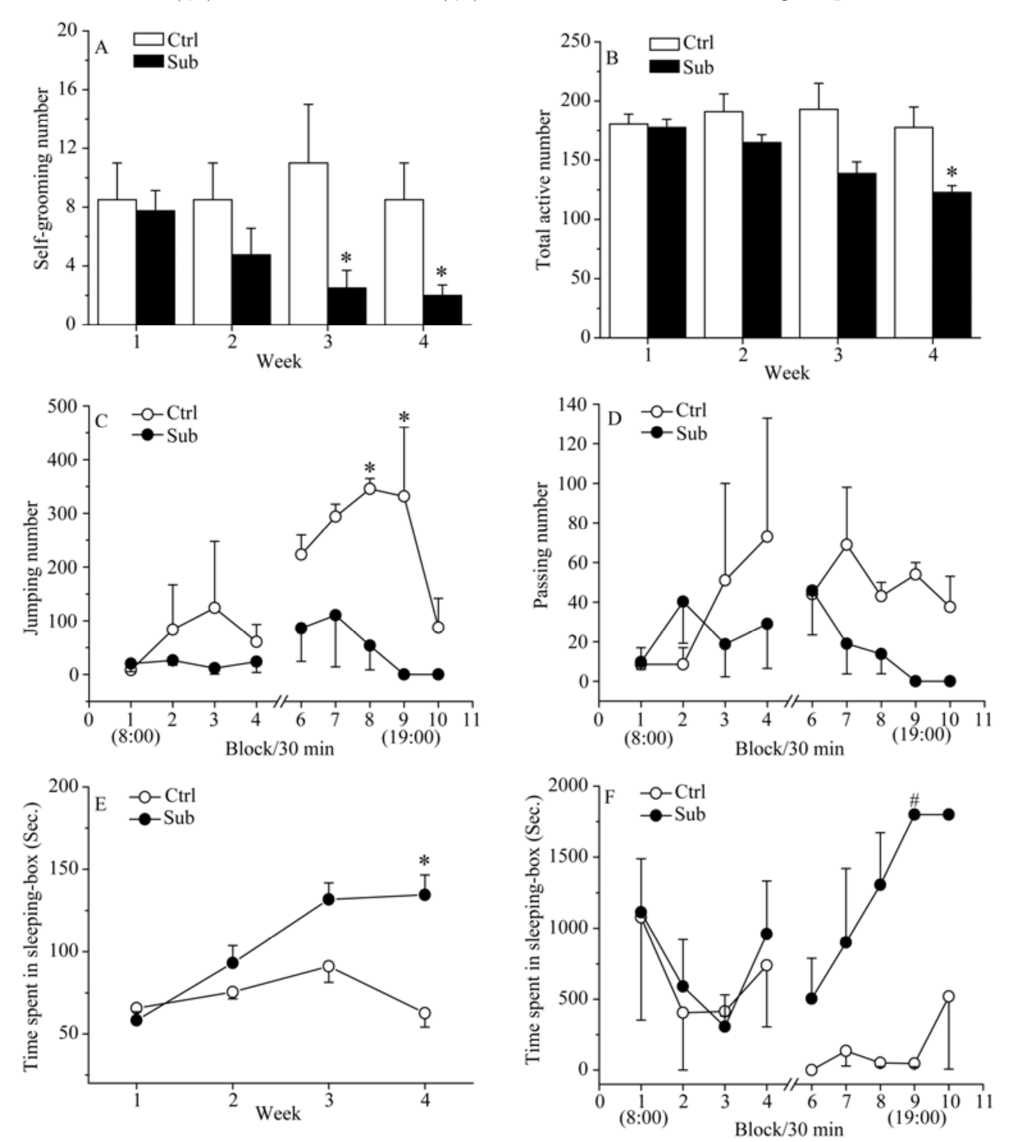


Fig. 3 Effect of chronic social defeat on different behavioral indexes

The subordinate tree shrews (Sub) showed a significance decrease in self-grooming behaviors (A) and locomotor activities (B−D) compared to the controls (Ctrl). The Sub group showed more inactivity by staying in the sleeping-box during their active phase (E, F). A, B, E shows statistical data for a 15-min period between 18:00 and 19:30; C, D, F shows statistical data from 8:00 to 10:00 and 17:00 until 20:00 in the fourth week. The blocks of 1−4 indicate 8:00−10:00; the blocks of 6−10 indicate 17:30−20:00. * P<0.05, # P=0.000.

The Sub tree shrews lost 5%~10% in body weight after chronic social defeat, while the Ctrl group exhibited a small increase over the same time period (Fig. 4A). Animals subjected to chronic social defeat showed an increase in urinary cortisol levels (Fig. 4B,C), especially during their activity peak period [$F_{(1, 4)}$=7.837, P=0.049; $F_{(1, 4)}$ =25.353, P=0.007; $F_{(1, 4)}$ =10.149, P=0.010; Fig. 4C].

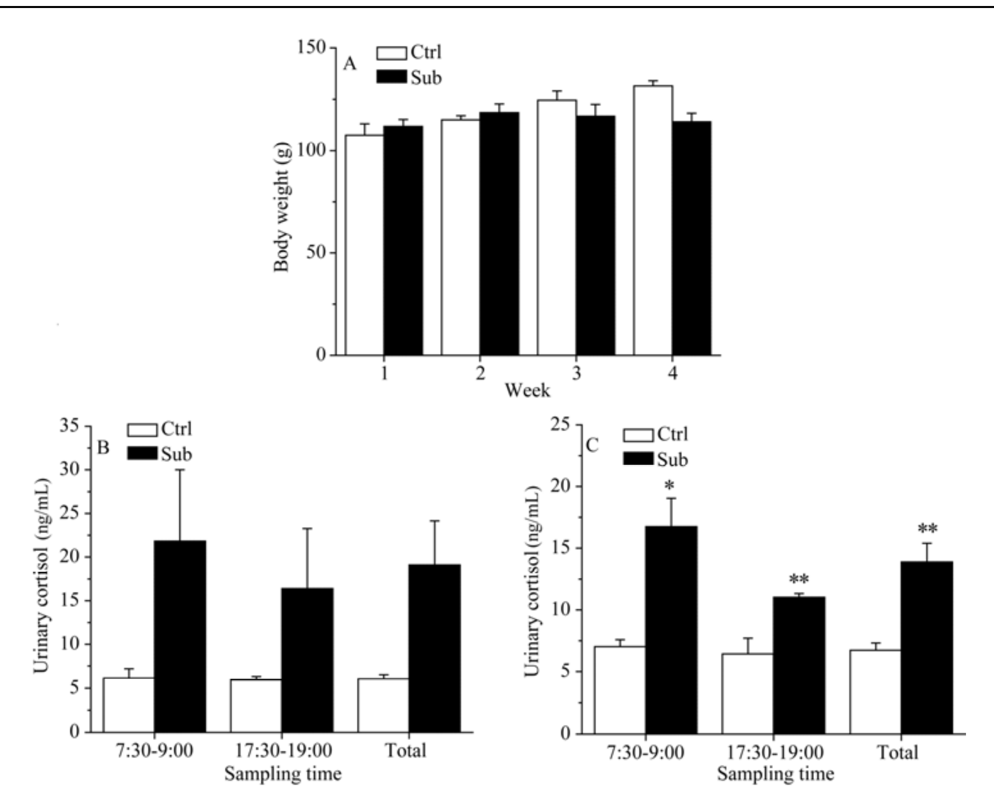
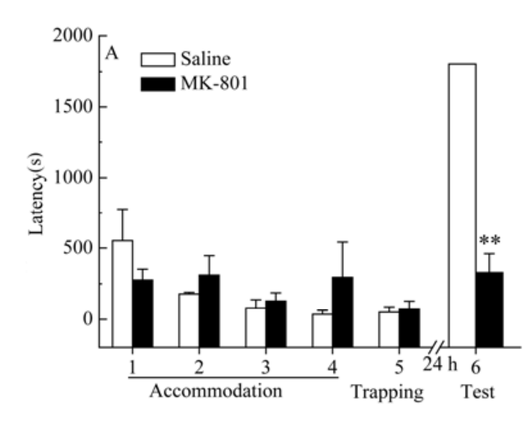


Fig. 4 Effects of chronic social defeat on body weight and urinary cortisol

Chronic social defeat reduced body weight in the subordinate (Sub) group (A). The Sub group showed a significant and sustained elevation of urinary cortisol (B was measured in the third week, and C was measured in the fourth week). * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.2 Learning and memory model

There was no difference between the saline and MK-801 groups in regards to latency to catch the bait and freezing time induced by apple replacement during the training process, indicating that the injected drug did not affect adaptation and learning (Fig. 5). Twenty-four hours after the fifth trapping trial, the latency to catch the bait increased significantly compared with training in saline-injected animals but not in MK801 injected animals [$F_{(1, 4)}=72.792$, $P=0.001$; Fig. 5A].



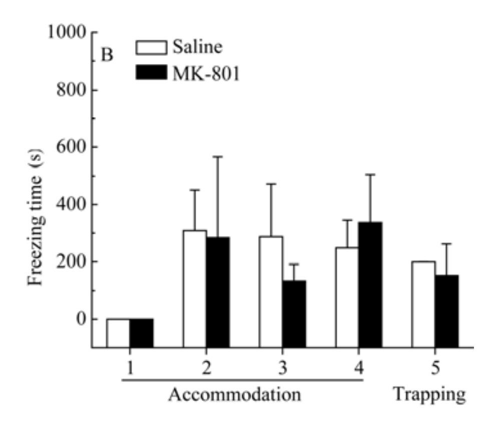


Fig. 5 The NMDA receptor antagonist MK-801(0.2 mg/kg) prevented the formation of captive memory in tree shrews

A) Twenty four hours after the final training trial, the MK-801group had significantly shorter latency than the saline group. B) Tree shrews showed freezing behavior after technician changed apple piece. Freezing time was not significantly different by groups. ** $P<0.01$.

3 Discussion

We demonstrated a chronic social defeat model of depression and a novel one-trial captive conditioning model of learning and memory in tree shrews. Although these pilot studies require further study, the results already broaden understanding of the behaviors in the tree shrew, the closest relative to primates. The present

study is important for establishing tree shrew models of depression, learning, and memory for mechanism studies and preclinical drug evaluation. One could expect that the data from the tree shrew may be more appropriate than those from other mammals to conditions in human beings.

In the depression model, we investigated the effects of chronic social defeat on the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). Subordinates showed alterations in body weight and behaviors, and increases in urinary cortisol levels. Remarkably, these alterations were persistent for at least two weeks. The time spent in the sleeping-box also increased. All these data suggest a set of depressive symptoms similar to those observed in human depression patients with stress symptoms. The present results are consistent with previous reports (Kozicz et al, 2008; Fuchs & Flügge, 2002). Future research should focus on what drug mechanisms can prevent or treat these depression-like symptoms in tree shrews.

In the one-trial captive condition model of learning and memory, latency progressively decreased in trials 1-5, suggesting a process of adaptation. In the final trial, however, tree shrews entered the cage and were trapped for 1 h after they ate bait apple. The one-trial trapping led to a large increase in latency in the test trial conducted on day 2 (24 h later), which suggested that tree shrews formed a captive memory and avoided entering the cage. Furthermore, we demonstrated that a NMDA receptor antagonist given before the adaptation process did not affect adaptation as indicated by the latency in adaptation. It did, however, prevent the formation of captive memory as indicated by much shorter latency in the test trial than the saline treatment. These results are similar to previous rodent studies (Boultadakis & Pitsikas, 2010). NMDA receptor plays a critical role in learning and memory in a variety of species (Bliss & Collingridge, 1993; Kovacic & Somanathan, 2010). Thus, the fact that the NMDA receptor antagonist MK-801 prevented the formation of captive memory strongly suggests that one-trial captive conditioning indeed forms a captive memory. Since adaptation latency was not affected by MK-801 (Fig. 5), other explanations were excluded. Nevertheless, future study would better test whether captive memory depends on the final trapping trial or whether the formation of a captive memory requires 24 h. Most importantly, the underlying mechanism for establishing captive memories needs to be studied.

The present results demonstrate a pilot study on behaviors of the tree shrew and suggest a promising future in animal research fields of depression, learning and memory as tree shrews are closely related to primates. One of the best applications of tree shrew models could be preclinical evaluation of drugs, as previous evidence shows that rodent models are very different to humans, which might be one of the major reasons contributing to high failure in clinical trials for new drugs.

Acknowledgments: We greatly thank the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College for the urine sample tests, XIE Gui-Fen for behavioral video counting.

References:

Bartolomucci A, de Biurrun G, Czéh B, van Kampen M, Fuchs E. 2002. Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress [J]. *Eur J Neurosci*, **15**(11): 1863-1866.

Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory-long-term potentiation in the hippocampus [J]. *Nature*, **361**(6407): 31-39.

Boultadakis A, Pitsikas N. 2010. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-name on recognition and spatial memory deficits produced by different NMDA receptor antagonists in the rat [J]. *Neuropsychopharmacology*, **35**(12): 2357-2366.

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (22): 12796-12801.

Fuchs E, Flügge G. 2002. Social stress in tree shrews: Effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, **73**(1): 247-258.

Fuchs E, Kramer M, Hermes B, Netter P, Hiemke C. 1996. Psychosocial stress in tree shrews: Clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, **54**(1): 219-228.

Helgen, Kristofer M, Wilson, Don E, Reeder, DeeAnn M. 2005. Mammal Species of the World (3rd ed.) [M]. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 104-109.

Holst D. 1977. Social stress in tree-shrews: Problems, results, and goals [J]. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physio*l, **120**(1): 71-86.

Janecka JE, Miller W, Pringle TH, Wiens F, Zitzmann A, Helgen KM, Springer MS, Murphy WJ. 2007. Molecular and genomic data identify the closest living relatives of primates [J]. *Science*, **318** (5851): 792-794.

Kovacic P, Somanathan R. 2010. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801) Electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, **3**(1): 13-22.

Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. 2008. Chronic

psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew [J]. *Psychoneuroendocrinology*, **33**(6): 741-754.

Magariños AM, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews [J]. *J Neurosci*, **16**(10): 3534-3540.

Meyer U, van Kampen M, Isovich E, Flügge G, Fuchs E. 2001. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews [J]. *Hippocampus*, **11**(3): 329-336.

Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E. 1998. Assessing cognitive functions in tree shrews: Visual-spatial and spatial learning in the home cage [J]. *J Neurosci Methods*, **81**(1-2): 35-40.

Takahashi M, Ushitani T, Fujita K. 2008. Inference based on transitive relation in tree shrews (*Tupaia belangeri*) and rats (*Rattus norvegicus*) on a spatial discrimination task [J]. *Psychol Rec*, **58**(2): 215-227.

Vales K, Bubenikova-Valesova V, Klement D, Stuchlik A. 2006. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats [J]. *Neurosci Res*, **55**(4): 383-388.

van der Hart MG, de Biurrun G, Czéh B, Rupniak NM, den Boer JA, Fuchs E. 2005. Chronic psychosocial stress in tree shrews: Effect of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 and clomipramine on endocrine and behavioral parameters [J]. *Psychopharmacology* (Berl), **181**(2): 207-216.

van Kampen M, Schmitt U, Hiemke C, Fuchs E. 2000. Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioural and endocrine changes in male tree shrews [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, **65**(3): 539-546.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 31−39 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01031

正常猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中大麻素与阿片受体的表达

BACK

张庆余[1,2]，范晓娜[1]，曹 毅[1,*]

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223;
2. 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要：为应用猕猴和树鼩动物模型研究毒品成瘾对神经/免疫系统的影响提供基础数据，对大麻素及阿片受体在正常猕猴和树鼩神经系统和免疫系统的表达进行初步确定。采集正常猕猴和树鼩新鲜组织(皮质、小脑、脑干、海马、脊髓、脾脏)，应用半定量逆转录 PCR 和实时定量 PCR 的方法检测大麻素与阿片受体 mRNA 在猕猴和树鼩各组织中的表达情况。猕猴脑部各区包括脾脏均表达大麻素受体 1 (CNR1)，而大麻素受体 2 (CNR2)只表达于脾脏内。三类阿片受体中，mu(μ)受体表达最为广泛，在以上各组织中均有表达；delta (δ) 受体表达的组织最少，只在海马表达；kappa (κ) 受体表达介于两者之间，分别在皮质、小脑、脑干、脊髓中表达。在树鼩组织中，CNR1 和 CNR2 表达于整个大脑重要脑区中，且 CNR1 表达量高于同一区域内 CNR2 表达的量；脾脏中 CNR2 的表达较高，而 CNR1 不表达。三类阿片受体只有检测到μ受体在脑部与脾脏表达，且在各个脑区的表达量明显高于脾脏的表达量；δ受体和 κ 受体在被检各个组织中均无表达。总体而言，两种大麻素受体在猕猴和树鼩体内表达情况与人类和鼠的情况类似，而三类阿片受体在猕猴体内表达情况与人类更为接近。猕猴和树鼩可能可用于人类毒品成瘾的研究；猕猴在某些神经受体的表达更接近人类，其在研究毒品成瘾的机理和对免疫系统的影响方面仍有不可替代的地位。

关键词：猕猴；树鼩；大麻素受体；阿片受体；mRNA 表达；神经系统；免疫系统
中图分类号：Q959.832; Q959.842; R338.2; R971.3 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0031-09

Expression of cannabinoid and opioid receptors in nervous as well as immune systems of *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri*

ZHANG Qing-Yu[1,2], FAN Xiao-Na[1], CAO Yi[1,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, *Kunming Yunnan* 650223, *China*; 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: To make *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri* as experimental animals for studying functions of opioid and cannabinoid receptors in drug addiction, we examined expression of the opioid and cannabinoid receptors in nervous and immune system of the two animals. We dissected normal adult *M. mulatta* and *T. belangeri*, collected tissues of cortex, cerebellum, brain stem, hippocampus, spinal cord, and spleen, and then applied the semi-quantitative PCR and real-time quantitative PCR methods to investigate the mRNA expression levels of the opioid and cannabinoid receptors in these tissues. In *M. mulatta*, the cannabinoid receptor 1 (CNR1) mRNA was expressed in the all tissues; in contrast, the cannabinoid receptor 2 (CNR2) mRNA was only present in the spleen. The mu opioid receptor (MOPR) was detected in all tissues, and the kappa opioid receptor (KOPR) was found in the cortex, cerebellum, brain stem, and spinal cord, but not in hippocampus and spleen. However, the delta opioid receptor (DOPR) was restrictively expressed in the hippocampus. In *T. belangeri*, CNR1 and CNR2 were expressed in the five regions of the brain. CNR2, but no CNR1, was also detected in the spleen. MOPR was expressed in all examined tissues, and its expression levels in the brain were higher than that in the spleen. DOPR and KOPR were not found in all tissues. Taken together, the expression profiles of cannabinoid receptors in human being, *M. mulatta*, *T. belangeri*, and rat were similar, and the expression patterns of the

---

收稿日期：2010-12-06；接受日期：2011-01-19
基金项目：中国科学院基础前沿研究专项项目（KSCX2-EW-J-23）；中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室资助项目
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: caoy@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：张庆余，男，硕士研究生，研究方向：毒品成瘾机理, E-mail:zqy0401@hotmail.com

opioid receptors in *M. mulatta* were more close to human beings. The opioid and cannabinoid receptors were expressed in the tissues of nervous and immune systems of *M. mulatta* and *T. belangeri*, and both animals could be used for studying drug addiction. *Macaca mulatta* is still the best experimental animal for drug addiction research because it shows very similar expression profiles of these receptors to human beings.

Key words: *Macaca mulatta*; *Tupaia belangeri*; Cannabinoid receptor; Opioid receptor; mRNA expression; Nervous system; Immune system

对于研究人类神经−精神疾病，非人灵长类动物模型具有独特优势和不可替代的作用。猕猴作为最常用的非人灵长类实验动物，已广泛应用于人类神经−精神疾病的研究，如毒品成瘾、抑郁症等。树鼩是进化上特殊的物种，其神经系统结构与灵长类较为接近 (Sofroniew et al, 1981; Jiao et al, 2010)，已有树鼩作为实验动物应用于神经系统研究的报道 (Fuchs, 2005; Pawlik et al, 1999; Podlisny et al, 1991)。然而，在分子水平系统研究毒品成瘾相关的大麻素受体与阿片受体在猕猴和树鼩的表达，尚未见报道。

毒品成瘾(drug addiction)与各个脑区，尤其是与学习记忆相关的结构，如大脑前皮质区(PFC)、海马(HIP)、腹侧被盖区(VTA)、伏隔核(NAc)密切相关(Volkow et al, 2002; Bruijnzeel, 2009; Peters et al, 2009)。一般认为，毒品成瘾过程中，毒品中的致瘾成分与神经系统分布的各类受体(阿片受体、大麻素受体)结合(Maldonado, 2010; López-Moreno et al, 2010; Robledo, 2010)，从而改变神经元兴奋性，最终导致神经可塑性改变，改变整个神经网络的功能，引起毒品躯体依赖，甚至出现心理依赖。其中大麻素受体在参与毒品成瘾过程担当了重要的角色 (López -Moreno et al, 2010; Robledo, 2010)。至今已经发现大麻素受体有两种类型，大麻素受体 1 (CNR1)和大麻素受体 2 (CNR2)。两种大麻素受体都为七次跨膜的 G 蛋白偶联受体，人的 CNR1 和 CNR2 氨基酸序列有 44%的同源性，在跨膜区氨基酸序列同源性达到 68 % (Jean et al, 2010)。CNR1 主要分布于神经系统神经元上，其余在生殖系统与消化系统也有低的表达; CNR2 主要分布于免疫系统各类细胞膜表面，是免疫系统特异的大麻素受体，另外在胶质细胞也有表达，参与脑部炎症反应的调节(Jean et al, 2010; Martykánová, 2010)。阿片受体作为阿片类物质作用的经典靶位，参与阿片类物质成瘾的过程。阿片受体共有三类：mu(μ)受体、delta (δ)受体和 kappa (κ)受体。三类阿片受体下有各种亚型，各种亚型的分布各不相同。尽管三种受体在人体分布不同，结合各类配体亦有其特异性，但三类受体均为 G 蛋白偶联受体，主要分布于神经元细胞，调节神经网络的功能。亦有报导阿片受体分布于免疫系统的细胞 (Bidlack et al, 2006; Sharp, 2006)，参与细胞因子产生、免疫调节、细胞增殖、细胞凋亡等病理生理过程。

研究大麻素受体和阿片受体在猕猴和树鼩脑区及脾脏的分布情况，是将两者应用为毒品成瘾动物模型，研究毒品成瘾机制、毒品成瘾过程免疫系统功能紊乱的前期工作，具有实际意义。本实验以猕猴和树鼩为实验对象，采用逆转录 PCR(RT-PCR)的方法，检测大麻素受体和阿片受体在它们脑区及脾脏组织的表达，为猕猴和树鼩作为神经/免疫系统疾病研究的动物模型提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

冷冻离心机，Bio-Rad Mycycler PCR 仪，ABI stepone plus 实时定量 PCR 仪，百泰克 Highpure RNAse-free 总 RNA 提取试剂盒，pormega 反转录试剂盒，RNase free PCR 管，sigma jumpstart taq 酶，SYBR green Ⅰ, DNTP。

1.2 实验动物

2 只正常成年猕猴，年龄分别是 11 岁和 3.5 岁，体重分别为 41.5 kg 和 35 kg。正常喂养成年树鼩 5 只，体重 120～160 g。实验动物实验前未给过任何药物。实验动物由中国科学院昆明动物研究所实验动物中心提供[SCXK (滇) 2008-0001]，所有动物均按照动物饲养要求及动物福利进行饲养。

1.3 实验方法

1.3.1 解剖取材

在动物进食前，空腹注射 3%戊巴比妥钠(1.2 mL/kg)，麻醉后处死。取出脑组织，分别采取大脑皮质、小脑、海马、中脑、脊髓。脾脏组织也被采取。所有新鲜组织装入 1.5 mL RNase-free 的管子，

冻存于液氮中备用。

1.3.2　反转录

将冻存于液氮中的组织取出，放入预冷的研钵中，捣成块，取大约 50 mg 样品，其余装回管子。加液氮到研钵中将组织研磨成粉后，加 1 mL 裂解液(百泰克总 RNA 提取试剂盒)，边裂解边研磨，充分研磨后将匀浆收集装入 RNase-free 1.5 mL 管子，静置 5 min。以后步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。收集到的 RNA 进行 RNA 定量及电泳检测其质量。取 2～3 μg RNA 逆转成 cDNA。50 μL 逆转体系包括: 5 μL 100 μmol/L 的 6 碱基随机引物、2 μL 逆转录酶(promega 公司)、2.5 μLDNTP mixture(10 mmol/L，上海生工)、 0.7 μLRNA 酶抑制剂 (takara 公司)、无 RNA 酶水(RNase-free H_20) 4.8 μL。37℃保温 1 h 以上，使 RNA 逆转，得到的 cDNA 用做 PCR 模板。

1.3.3　引物设计挑选

由于树鼩基因组测序没有完成，现在 GeneBank 尚无法获得各种基因的 cDNA 序列。因此，通过对比人、猕猴、大鼠、小鼠大麻素受体 mRNA 序列找出保守区域，确定引物位置，设置通用引物来对相应的受体进行扩增。设计好并合成的引物通过 PCR 检测，选择扩增效率高、特异性好的引物来检测各组织中相应受体 mRNA 的表达。两种大麻素受体和三种阿片受体的通用引物设计过程与大麻素受体通用引物设计过程一样。各受体 PCR 通用引物序列见表 1。

表 1　实验中所用的引物序列

Tab. 1　The primers used in the study

受体 Receptors	正向序列 Forward primer	反向序列 Reversed primer	产物长度 Products length (bp)
CNR1	5'AGTATGCTCTGCCTGCTGAA3'	5'GAGTCCCCCATGCTGTTATC3'	140
CNR2	5'CCCGTGGGAGGGCACTGGT3'	5'GGCACCTGCCTGTCCTGGT3'	259
MOPR	5'TCTTCGGAAACTTCCTGGTCA3'	5'TGCAGAGGGTGAATATGCTGG3'	230
DOPR	5'GCCACCAGCACGCTGCCT3'	5'GTTGATCAGCTTGGCCTTGG3'	217
KOPR	5'CCTGGCTTTGGCAGATGCTT3'	5'CATGTTGTAGTAATCAATGGAA3'	127
β-actin	5'GCCCTGAGGCTCTCTTCCA3'	5'CGGATGTCCACGTCACACTT3'	100

CNR1：大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1); CNR2：大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2); MOPR：μ型阿片受体 (mu opioid receptor); DOPR：δ型阿片受体 (delta opioid receptor); KOPR：κ型阿片受体 (kappa opioid receptor)。

1.3.4　半定量 PCR

25 μL 的 PCR 反应体系里包括：19.6 μL 双蒸水、2.5 μL 缓冲液、0.5 μL DNTP mixture(10 mmol/L 上海生工)、上下游引物各 0.5 μL、0.4 μL jumpstart taq 酶 (sigma 公司)、1 μL 逆转好的 cDNA 作模板。同时，设置阳性对照和阴性对照。各受体扩增条件为：95℃预热变性 1min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 70℃ 10 s，共 20 个循环; 95℃变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 10 s，根据不同受体的丰度选择不同的扩增循环数(18±2); 70℃后延伸 5 min。β-actin 内参扩增条件为：95℃预热变性 1 min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 70℃ 10 s，共 20 个循环; 70℃后延伸 5 min。PCR 扩增完成后取产物 5～8 μL，在含有溴化乙锭(EB)的 2%琼脂糖胶中, 120 伏电压电泳 30 min，凝胶成像仪检测。

1.3.5　实时定量 PCR

实时定量 PCR 所用模板和引物与半定量 PCR 相同。实时定量 PCR 反应体系为：19.1 μL 双蒸水、2.5 μL 缓冲液、0.5 μLDNTP mixture (10 mmol/L 上海生工)、上下游引物各 0.5 μL、0.4 μL jumpstart taq 酶 (sigma 公司)、0.5 μL 10xSYBR green Ⅰ、1 μL 逆转好的 cDNA 作模板。同时，设置阴性对照以确定 PCR 过程中的本底荧光。每种引物每个样本做重复三管。采用ΔΔct 相对定量的方法，以 β-actin 作为内参，校正目的基因表达，获得目的基因在不同组织间的相对表达量。

2　结　果

2.1　Total RNA 提取与质量检测

分别抽提猕猴、树鼩脑区大脑皮质，小脑、中脑、海马、脊髓样品，抽提的 RNA 测定其浓度，按每孔 200 ng 进行琼脂糖电泳。电泳后，扫胶结果见图 1，18*S* 核糖体 RNA 和 28S 核糖体 RNA 条带相对完整，没有迷散，两者之间的比值接近 1/2,说明 RNA 的质量较好。

2.2　猕猴组织大麻素受体与阿片受体 mRNA 的表达

猕猴体内，大麻素受体 1 (CNR1)在脾脏及其余脑区内都表达，而大麻素受体 2 (CNR2)只在脾脏内有表达(图 2b,c)。阿片受体，μ受体在各个脑区和脾脏表达(图 2d); κ受体在皮质、小脑、脑干、脊髓中表达，在海马与脾脏中不表达见图 2(f)；与 κ 受体不同，δ受体在海马有表达，其余各处未检测到表达(图 2e)。实时定量 PCR 结果与半定量 PCR 结果一致 (图 2g)。

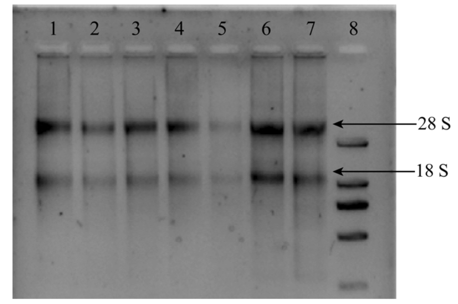


图 1 检查 RNA 的质量

Fig. 1 Quality control of the total RNA extracted

图为 2% 琼脂糖胶 total RNA 电泳图，点样孔所上样品来源依次是 1：皮质; 2：小脑; 3：脑干; 4：海马; 5：脊髓; 6：脾脏; 7：脾脏; 8 marker(D2000)。The total RNA were separated by gel electrophoresis in 2% agarose. 1: cortex; 2: cerebellum; 3: brain stem; 4: hippocampus; 5: spinal cord; 6: spleen; 7: spleen; 8: marker (D2000).

2.3 树鼩组织大麻素受体与阿片受体 mRNA 的表达

同样以通用引物扩增树鼩组织来源的 cDNA，两种大麻素和μ型阿片受体引物有扩增产物，且扩增长度与猕猴组织 cDNA 扩增得到的产物长度一致。为了进一步确定所得的 PCR 产物是目的基因，对 PCR 产物进行测序，测序结果如表 2。测序结果与 GenBank 中的转录本进行 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 比对，CNR1 BLAST 比对，选取测序可信区域 89 nt 用 BLAST 工具进行序列比对，发现质询范围达到的 88%时，该序列与小鼠和大鼠序列相似度到达 98%，质询范围达到 91%时，与人和猴的序列相似度也达到 95%。与其他物种的大麻素受体 1 的序列相似度也较高，最低相似度是 92%(更格卢鼠属)，同时没有发现除大麻素受体 1 的其他基因比对上；CNR2 BLAST 比对，选取测序可信区域 236 nt 比对，质询范围达到 97%时，与人的相似度达到 96%，而质询范围达为 97%时，与猕猴的相似度达到了 93%，质询范围为到 94%，与小鼠的相似度达到 82%，同时未发现有其他基因比对上；MOPR BLAST 比对结果，选取测序可信区域 175 nt，用 BLAST 工具进行序列比对，质询范围达到 99%时，与人和猕猴的序列相似度分别到达 94% 和 93%，而与大鼠和小鼠的相似度分别达到 91%和 88%，同时亦未发现其他任何基因比对上。这表明

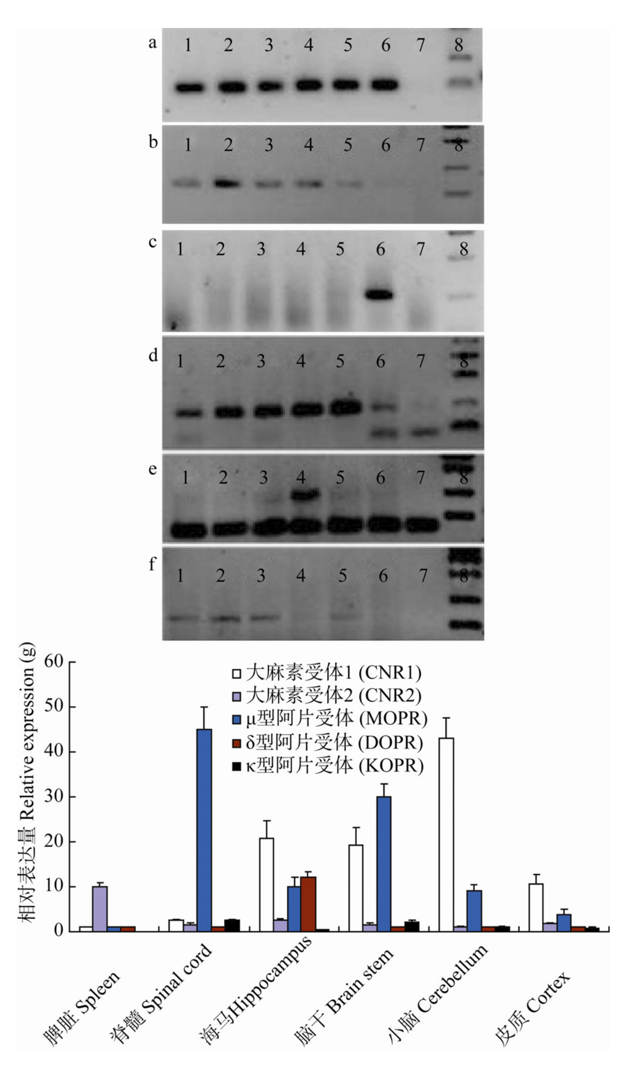


图 2 猕猴大麻素和阿片受体 mRNA 组织间相对表达情况

Fig. 2 Relative expression of cannabinoid and opioid receptors mRNA in the tissues of *Macaca mulatta*

1：皮质; 2：小脑; 3：脑干; 4：海马; 5：脊髓; 6：脾脏; 7：阴性对照(水); 8：marker (D20000)。a：β-actin (100 bp)，内参表达; b：大麻素受体 1 (CNR1, 140 bp); c：大麻素受体 2 (CNR2, 259 bp); d：μ型阿片受体 (MOPR, 230 bp); e：δ型阿片受体 (DOPR, 217 bp); f：κ 型阿片受体表达 (KOPR, 127 bp; g：实时定量 PCR 结果。采用ΔΔCt 相对定量的方法，将脾脏中 CNR1、MOPR、DOPR 受体表达量设定为 1，小脑中 CNR2、KOPR 受体表达量设定为 1。柱形图显示各受体在猕猴 6 种组织中的分布情况和相对表达量。

1: cortex; 2: cerebellum; 3: brain stem; 4: hippocampus; 5: spinal cord; 6: spleen; 7: negative control (H_2O); 8: DNA marker (D2000). a: β-actin (100 bp); b:CNR1 (140 bp); c: CNR2 (259 bp); d: MOPR (230 bp); e:DOPR (217 bp) ; f: KOPR (127 bp); g: The results of the real-time quantitative PCR analysis, The expression of CNR1, MOPR, DOPR in spleen was set to 1 and the expression of CNR2 and KOPR in cerebellum was set as 1 as well, The picture showed the relative expressions of each receptor in the six tissues of *Macaca mulatta*.

表 2　树鼩三类受体 PCR 产物测序结果

Tab. 2　The PCR products sequencing results of three receptors of *Tupaia belangeri*

	PCR 产物测序结果 PCR products sequencing results (5'—>3')
大麻素受体 1 (CNR1)	GCCCCTTACCGATCTCTATACTCTGAGGAGCAGGACCTGAGACATGC TTTCCGGAGCATGTTCCCCTCGTGTGAAGGCACTGCGCAACCTCTGG ATAACAGCATGGGGGACTCA
大麻素受体 2 (CNR2)	GTTCAGCTACTGACAAGCGTGACTATGACCTTCACAAGCCTCTGTAGGT AGGCTCCTGCTGAACGCCATTGACCGATACCTCTGCCTGCGCTATCCAC CTTCCTACAAAGCTCTGCTCACCCGTGGAAGGGCACTGGTCACCCTGG GCATCATGTGGGTCCTCTCAGCACTAGTGTCCTACCTGCCCTCATGGGA TAGACTTGCTGTCCCAGGCCCTGCTCTGAGCTTTTCCCACTGATCCACAA
μ 型阿片受体 (MOPR)	CGCGTTAACGTATCGATGGAGATCACGATCTTGCAAGGATGGTTCCAAA CGGCCACGTTCCCATTAGGTAATTGACACTCTGGAAGGGCAGGGTACTT GTTGCTAAAGCGTCTGCCAGGGCAAGGTTGAAAATGTAGATGTTGGTGG CAGTCTTCATTTTGGTGTATCTGACAATCACGTACATGACCAGGAAGTTT CCGAAGAA

表 3　各受体 mRNA 在猕猴与树鼩神经系统和免疫系统主要组织表达情况

Tab. 3　Expression profiles of the receptors at mRNA level in the nervous and immune systems of *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri*

物种和组织 Species and tissues	大麻素受体 Cannabinoid receptors		阿片受体 Opioid receptors		
	CNR1	CNR2	MOPR	DOPR	KOPR
猕猴 *Macaca mulatta*					
皮质 Cortex	+++	−	+	−	+
小脑 Cerebellum	++	−	+	−	+
脑干 Brain stem	++	−	++	−	+
海马 Hip	++	−	+	++	−
脊髓 Spinal cord	+	−	+++	−	+
脾脏 Spleen	+	++	+	−	−
树鼩 *Tupaia belangeri*					
皮质 Cortex	+	++	++	−	−
小脑 Cerebellum	+	+	+++	−	−
脑干 Brain stem	+	+	+	−	−
海马 Hip	+	+	+	−	−
脊髓 Spinal cord	+++	+	+	−	−
脾脏 Spleen	−	+	+	−	−

+：mRNA 表达 (Positive mRNA expression); −：mRNA 不表达 (Negative mRNA expression)。

三种扩增产物序列与目的基因的同源基因序列是高度相同的图 3 (a,b,c)。因此，认为通用引物扩增得到的 PCR 产物就是来源于对目的基因的扩增。通过 PCR 检测树鼩组织中三类受体表达，发现大麻素受体 1 (CNR1)除在脾脏外，其余脑区都表达；大麻素受体 2 (CNR2)在各个脑区，包括脾脏均有表达 (图 4b,c)；而阿片受体，仅检测到μ受体的在各个脑和脾脏表达，其余二类阿片受体无检测到表达(图 4d, e, f,)。实时定量 PCR 结果与半定量 PCR 结果基本一致(图 4g)。

3　讨　论

人类神经−精神疾病，如毒品成瘾，是严重的社会健康问题。毒品成瘾涉及多个神经受体，如大麻素受体与阿片受体等。毒品成瘾可导致严重神经−精神严重异常，也影响机体免疫功能。研究神经系统和免疫系统组织中毒品成瘾相关受体的表达和分布，对阐明毒品的神经−精神损伤及免疫异常机理有实际意义。逆转录 PCR(RT-PCR)是研究 mRNA 表达的常用方法，其敏感性和特异性都较高。本课题应用半定量和定量 RT-PCR 方法，研究猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中大麻素受体与阿片受体的表达情况。脾脏含有各型免疫细胞，在免疫器官中最具代表性，且取材容易。在本研究中我们用脾脏作为免疫系统的代表。我们的结果表明：猕猴体内大麻素受体 1 (CNR1) mRNA 在各个脑区和

a

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY522555.1	Mus musculus striatal cannabinoid receptor type 1 protein (Cnr1) ge	141	141	88%	5e-31	98%	
AY522554.1	Mus musculus striatal cannabinoid receptor type 1 protein (Cnr1) mR	141	141	88%	5e-31	98%	U G
NM_007726.3	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain) (Cnr1), mRNA	141	141	88%	5e-31	98%	U E G M
BC079564.1	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain), mRNA (cDNA clone MG	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
BC075644.1	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain), mRNA (cDNA clone IM/	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
BC070447.1	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain), mRNA (cDNA clone MG	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
AK139417.1	Mus musculus 10 days neonate cortex cDNA, RIKEN full-length enrich	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
U17985.1	Mus musculus brain-type cannabinoid receptor mRNA, complete cds	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
Y18374.1	Mus musculus gene encoding cannabinoid CB1 receptor	141	141	88%	5e-31	98%	E G
BX005292.13	Mouse DNA sequence from clone RP24-407G18 on chromosome 4 Cor	141	141	88%	5e-31	98%	
AF153345.1	Mus musculus CB1 cannabinoid receptor (Cnr1) mRNA, complete cds	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
NM_012784.4	Rattus norvegicus cannabinoid receptor 1 (brain) (Cnr1), mRNA >eml	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
U40395.1	Rattus norvegicus neuronal cannabinoid receptor (CB1) mRNA, compl	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
U40709.1	Mus musculus neuronal cannabinoid receptor (CB1) mRNA, complete	141	141	88%	5e-31	98%	U E G
U22948.1	Mus musculus CB1 cannabinoid receptor gene, complete cds	141	141	88%	5e-31	98%	E G
XM_002746806.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transcı	134	134	91%	9e-29	96%	G M
XM_002746805.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transcı	134	134	91%	9e-29	96%	G M
XM_002746804.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transcı	134	134	91%	9e-29	96%	G M
XM_002746803.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transcı	134	134	91%	9e-29	96%	G M
XM_002714573.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cannabinoid receptor 1-like, trans	134	134	91%	9e-29	96%	G M
XM_002714572.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cannabinoid receptor 1-like, trans	134	134	91%	9e-29	96%	G M
DQ355990.2	Cavia porcellus cannabinoid 1 receptor mRNA, partial cds	134	134	91%	9e-29	96%	G
XM_002817137.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript varia	128	128	91%	4e-27	95%	U G M
XM_002817136.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript varia	128	128	91%	4e-27	95%	U G M
XM_002817135.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript varia	128	128	91%	4e-27	95%	U G M
XM_002817134.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript varia	128	128	91%	4e-27	95%	U G M

b

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_001105018.2	PREDICTED: Macaca mulatta cannabinoid receptor 2 (macrophage) (	270	270	91%	2e-69	95%	G M
AC192160.5	Pan troglodytes BAC clone CH251-488P14 from chromosome 1, comp	254	254	93%	2e-64	93%	
XM_001166334.1	PREDICTED: Pan troglodytes cannabinoid receptor 2 (macrophage), (	254	254	93%	2e-64	93%	G M
XM_513201.2	PREDICTED: Pan troglodytes cannabinoid receptor 2 (macrophage), (	254	254	93%	2e-64	93%	G M
XM_002811294.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 2 (macrophage) (CNR	252	252	91%	6e-64	94%	G M
AB463463.1	Synthetic construct DNA, clone: pF1KB7157, Homo sapiens CNR2 gei	248	248	93%	8e-63	93%	
NM_001841.2	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage) (CNR2), mRNA	248	248	93%	8e-63	93%	U E G M
AL590609.15	Human DNA sequence from clone RP11-4M23 on chromosome 1 Cont	248	248	93%	8e-63	93%	E
AY242132.1	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (CNR2) gene, complete cds	248	248	93%	8e-63	93%	E G
AM156854.1	Homo sapiens partial mRNA for cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene)	248	248	93%	8e-63	93%	U E G
AJ430064.1	Homo sapiens CNR2 gene for peripheral cannabinoid receptor CB2	248	248	93%	8e-63	93%	E G
AJ430063.1	Homo sapiens mRNA for peripheral cannabinoid receptor CB2 (CNR2 g	248	248	93%	8e-63	93%	U E G
X74328.1	H.sapiens mRNA for CB2 (peripheral) cannabinoid receptor	248	248	93%	8e-63	93%	U E G
EU517121.1	Homo sapiens testis-dominant CNR2 isoform CB2 (CNR2) mRNA, comp	243	243	93%	4e-61	92%	U G
CU686989.1	Synthetic construct Homo sapiens gateway clone IMAGE:100022674	243	243	93%	4e-61	92%	
BC074767.2	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage), mRNA (cDNA cl	243	243	93%	4e-61	92%	U E G
BC069722.1	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage), mRNA (cDNA cl	243	243	93%	4e-61	92%	U E G
AM156855.1	Homo sapiens partial mRNA for cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene),	243	243	93%	4e-61	92%	U E G
BC095545.1	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage), mRNA (cDNA cl	237	237	93%	2e-59	91%	U E G
AM156856.1	Homo sapiens partial mRNA for cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene),	237	237	93%	2e-59	91%	U E G

c

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_002817504.1	PREDICTED: Pongo abelii mu-type opioid receptor-like, transcript var	267	267	99%	2e-68	94%	G M
XM_002817503.1	PREDICTED: Pongo abelii mu-type opioid receptor-like, transcript var	267	267	99%	2e-68	94%	G M
XM_002817502.1	PREDICTED: Pongo abelii mu-type opioid receptor-like, transcript var	267	267	99%	2e-68	94%	G M
XM_003121140.1	PREDICTED: Sus scrofa mu-type opioid receptor-like (LOC100514882	263	263	98%	3e-67	94%	G M
L38645.1	Sus scrofa mu opioid receptor mRNA, complete cds	263	263	98%	3e-67	94%	U G
AB590577.1	Synthetic construct DNA, clone: pFN21AB6696, Homo sapiens OPRM	261	261	99%	9e-67	93%	
NG_021208.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), RefSeqGene on chrom	261	261	99%	9e-67	93%	
GQ258059.1	Homo sapiens opioid receptor mu 1 transcript variant hMOR-1JL (OPF	261	261	99%	9e-67	93%	U G
NM_001145283.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145282.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145286.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145287.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145284.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145281.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145280.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001145279.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
NM_001008504.2	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U E G M
NM_000914.3	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U E G M
NM_001145285.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOF	261	261	99%	9e-67	93%	U G M
AL136444.16	Human DNA sequence from clone RP3-366F13 on chromosome 6, con	261	261	99%	9e-67	93%	E
EU340243.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1G2 (OPRM1) ı	261	261	99%	9e-67	93%	U G
EU340242.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1G1 (OPRM1) ı	261	261	99%	9e-67	93%	U G
EU340241.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1i (OPRM1) mF	261	261	99%	9e-67	93%	U G
AK313901.1	Homo sapiens cDNA, FLJ94538, highly similar to Homo sapiens opioid	261	261	99%	9e-67	93%	U G
EF666090.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1K1 (OPRM1) r	261	261	99%	9e-67	93%	U G

图 3 树鼩大麻素受体 1、大麻素受体 2 及μ型阿片受体 PCR 产物测序得到的序列，与 GeneBank 中的所有已有物种的全部转录本通过 BLAST 进行序列比对的结果

Fig. 3 Comparison of the CNR1, CNR2 and MOPR sequences obtained from the tissues of *Tupaia belangeri* with the GeneBank transcription database using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

a: CNR1 BLAST 比对结果; b: CNR2 BLAST 比对结果; c: MOPR BLAST 比对结果(由于截图区域有限，少部分物种比对结果未显示)。

a: the comparative results of CNR1; b: the comparative results of CNR2; c: the comparative results of MOPR.

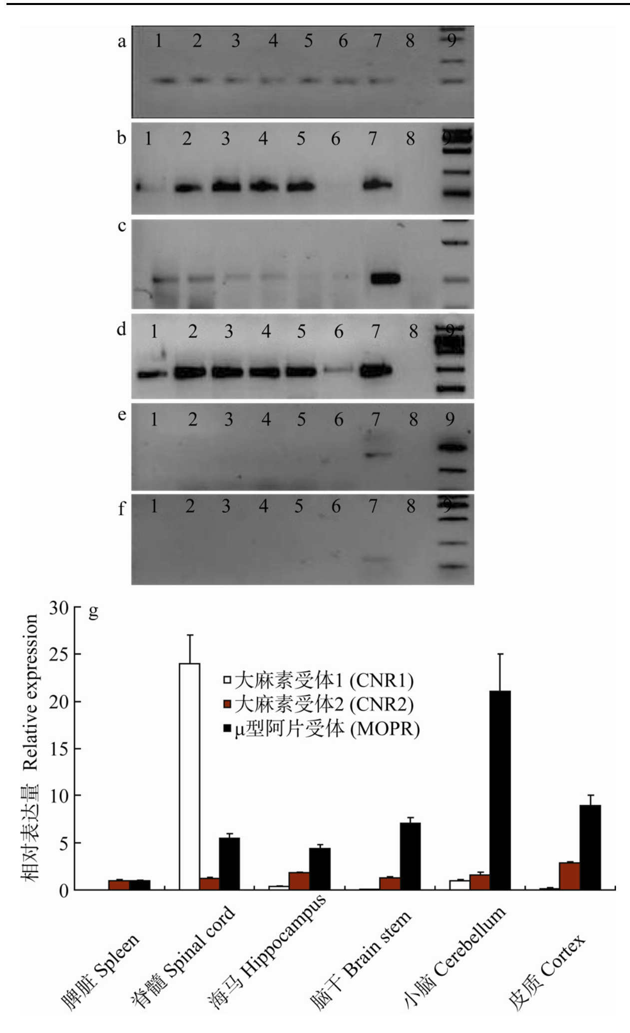


图 4　树鼩大麻素受体与阿片受体 mRNA 组织间相对表达情况

Fig. 4　Relative expression of the cannbinoid receptors and opioid receptors mRNA in the tissues of *Tupaia belangeri*

1：皮质; 2：小脑; 3：脑干; 4：海马; 5：脊髓; 6：脾脏; 7：阳性对照(基因组 DNA 或猕猴 cDNA); 8：阴性对照(水); 9: marker(D20000)。a：内参 β-actin (100 bp); b：大麻素受体 1(NCR1, 140 bp); c：大麻素受体 2(NCR2, 259 bp); d：μ型阿片受体(MOPR, 230 bp); e：δ 型阿片受体(DOPR, 217 bp); f：κ 型阿片受体表达(KOPR, 127 bp); g：实时定量 PCR 结果. 采用ΔΔCt 相对定量的方法, 将脾脏中 CNR2 和 MOPR 表达量设定为 1, 将小脑中 CNR1 表达量设定为 1. 柱形图显示受体在树鼩 6 种组织中的分布情况和相对表达量。

mRNA in the tissues of *Tupaia belangeri* tissues. 1: cortex; 2: cerebellum; 3: brain stem; 4: hippocampus; 5: spinal cord; 6: spleen; 7: positive control (treeshrew genomic DNA or macaca cDNA); 8: negative control(H_2O); 9: marker(D2000). a: β-actin(100 bp); b: CNR1(140 bp); c: CNR2 (259 bp); d: MOPR(230bp); e：DOPR (217bp); f: KOPR (127 bp); g: The results of the quantitative real-time PCR analysis. The expressions of CNR2 and MOPR in spleen were set to 1 and the expression of CNR1 was set to 1 as well. The picture showed the relative expression levels of each receptor in the six tissues of *T. belangeri*.

脾脏都有表达，而大麻素受体 2 (CNR2) mRNA 仅检测到在外周的脾脏表达；在树鼩体内大麻素受体 1 除在脾脏外，在各个脑区也均有表达，这与猕猴稍有不同，而大麻素受体 2 在树鼩各个组织中均有表达，与猕猴相比差别较大。阿片受体 mRNA 在树鼩体内表达模式相对简单，只检测到有 mu 型阿片受体(MOPR)mRNA 表达，δ型和κ型两种阿片受体在各个组织没有检测到表达。相比于树鼩，猕猴体内阿片受体表达情况较为复杂，μ型阿片受体(MOPR)与树鼩表达情况一样，在这几个组织中均表达，而δ型阿片受体(DOPR)只在海马表达，κ型受体(KOPR) mRNA 在皮质、小脑、脑干和脊髓处表达。除了表达外，同一受体在不同的组织中表达量也不尽相同，如大麻素受体 1 在猴各脑区中表达丰度，高于脊髓与脾脏；μ型阿片受体(MOPR)mRNA 在猕猴的脊髓表达最高，其次是脑干、海马、小脑、皮质，表达最低的是脾脏。同一受体的 mRNA 在不同的物种表达模式也有区别，例如大麻素受体 2 在树鼩的 6 类组织中均有表达，但在猴的组织当中仅有外周的脾脏表达。再有κ型阿片受体(KOPR)mRNA 在猕猴的皮质、小脑、脑干、脊髓有表达，但是在树鼩体内这四种器官当中均没有检测到表达。这些结果说明各类受体表达方式是很复杂的，这可能跟物种生存环境，遗传进化因素等有关。

由于进化地位高低，物种之间同一受体表达谱各异。人的大麻素受体 1 在脑在广泛表达，主要在于突触前神经元上，调节神经元的兴奋性；在脊神经元，同样有大麻受体 1 的分布，参与感觉传递；免疫系统组织尚未发现有其分布。人大麻素受体 2 主要分布于免疫系统组织、细胞当中，参与免疫调节、炎症反应等生理病理过程；正常状态下，脑和脊髓中分布较少，主要存在于胶质细胞中；病理过程时(炎症反应)，含量会增加 (Onaivi et al, 2006; Emmanuel, 2006)。三种阿片受体在人脑与脊髓中都有表达，在免疫系统组织、细胞中亦有分布(Perry et al, 2004; Sharp, 2006)。鼠的大麻素受体 1 主要分布于脑区和脊髓的神经元突触上，我们实验发现脾脏中也有较低的大麻素受体 1 的表达；大麻素受体 2 作为免疫系统的特有的大麻素受体类型，广泛存在于鼠免疫相关的细胞当中，现在研究也发现功能性的大麻素受体 2 也分布在鼠的很多脑区(大脑皮质、胼胝体、海马、基底核区及小脑浦肯野细胞层、脑桥)，参与了某些生理病理过程。三种阿片受体的在鼠体内表达相对而言都较为丰富，正常情况下都存在于脑区、脊髓、免疫细胞当中 (Bagnoli et al, 2003; Wu et al, 2009)，机体应激状态下表达会随之发生改

变，协调机体对外界环境的适应(Sharp, 2006)。

总体看来，猕猴体内无论是大麻素受体还是阿片受体表达模式均与人更为接近。树鼩体内大麻受体表达模式与人基本相同，而三类 (μ、κ、δ)阿片受体，只检测到 μ 型受体的表达，其他两种阿片受体在任何组织中均未检测到有其mRNA表达，这与人相差较大。这可能意味着树鼩的阿片受体的表达与大麻素表达相比，更有选择性。在进化地位上，大麻素受体可能更为保守，参与基本的神经活动(奖赏效应、痛觉传递、恐惧记忆)，而阿片受体可能与与灵长类高级认知功能 (学习记忆、认知创造、复杂情绪等)关系更为密切。与树鼩相比，猕猴大麻素受体与阿片受体表达与人较为接近，这反映了猕猴的进化地位更高，受体表达模式与人更为相似；但也应当看猕猴体内大麻素受体 2 仅表达于脾脏。这与人不同，人脑区有大麻素受体 2 的表达，这提示我们大麻素受体 2 在进化过程中最初的组织起源可能是免疫系统组织，随着进化过程的发展逐渐表达于神经系统，连结神经免疫两大系统，并在神经免疫的过程中发挥作用。

本实验由于通用引物设计过程中引物对的选择余地不足，所用的通用引物没有检测到 δ 型和κ型两种阿片受体在树鼩各个组织的表达。尽管通用引物可以扩增包括人、猕猴、大鼠、小鼠等多种物种的 cDNA，但是仍不能排除在树鼩体内两类受体序列可能会与通用引物存在不匹配的情况，从而导致PCR检测失败，所以对于这两类受体的表达仍要进一步确定。我们还明确指出，mRNA 的表达情况只是从一个方面反映其对应的基因的表达情况，有时 mRNA 表达量并不一定真实反应基因编码的蛋白质的含量，更不能反映其蛋白定位。另外，对大麻素与阿片受体在免疫系统中表达情况，我们只检测了有代表性，且取材相对容易的脾脏，而对其他免疫器官如胸腺、骨髓，对特定免疫细胞，如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞、K 细胞、NK 细胞等的表达此研究尚未涉及，这将限制神经免疫学的研究。因此，下一步将通过 Rapid Amplification of cDNA End (RACE) 等方法获取受体基因的 cDNA 全长、克隆、蛋白体外表达，最终获得有活性的蛋白，制备相应抗体，进而对这几种重要的受体在神经系统/免疫系统各类组织，包括具体不同类型细胞在 mRNA 和蛋白质两种水平上进行深入研究，以期全面认识猕猴和树鼩，更好地开发利用这些动物资源用于人类疾病的研究。

致谢：感谢中国科学院昆明动物研究所动物中心提供的实验用猕猴和树鼩。感谢昆明动物研究所分子病理实验室全体工作人员及部分研究生在动物解剖方提供的帮助。感谢后期审稿人的辛勤劳动和提供的修改意见。

参考文献：

Bagnoli P, Dal Monte M, Casini G. 2003. Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals [J]. *Histol Histopathol*, **18**(4): 1219-1242.

Bidlack JM, Khimich M, Parkhill AL, Sumagin S, Sun B, Tipton CM. 2006. Opioid receptors and signaling on cells from the immune system [J]. *J Neuroimm Pharmacol*, **1**(3): 260-269.

Bruijnzeel AW. 2009. kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function [J]. *Brain Res Rev,* **62**(1): 127-146.

Emmanuel SO. 2006. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain [J]. *Neuropsychobiology*, **54**: 231–246.

Fuchs E. 2005. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder [J]. *CNS Spectr*, **10**(3): 182-190.

Perry GF, Russell K. Portenoy RK .2004. The Endogenous Opioid System[M]// McGraw Hill. A Clinical Guide to Opioid Analgesia. New York:Vendome Group, 9-15.

Jean GL, Gran B, Constantinescu CS. 2010. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system [J]. *Immunobiology*, **215**(8): 606-610.

Jiao JL, He BL, Zheng H, Li B, Shen PQ. 2010. The comparative study of brain development among tree shrews (*Tupaia blangeri chinensis*) rhesus monkeys and rats [J]. *J Kunming Med Univ*, **5**: 39-41. [角建林, 何保丽, 郑 红, 李 波, 沈培清.2010. 树鼩、恒河猴和大鼠脑发育的比较研究. 昆明医学院报, **5**: 39-41.]

López-Moreno JA, López-Jiménez A, Gorriti MA, Fonseca FR. 2010. Functional interactions between endogenous cannabinoid and opioid systems: focus on alcohol, genetics and drug-addicted behaviors [J]. *Curr Drug Targets*, **11**(4): 406-428.

Maldonado R. 2010. The endogenous opioid system and drug addiction [J]. *Ann Pharm Fr*, **68**(1): 3-11.

Martykánová L. 2010. Endocannabinoid system I--the role in regulation of physiology functions [J]. *Cas Lek Cesk*, **149**(8): 363-367.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain [J]. *Ann N Y Acad Sci*, **1074**: 514-536.

Pawlik M, Fuchs E, Walker LC, Levy E. 1999. Primate-like amyloidβ sequence but no cerebral amyloidosis in aged tree shrews [J]. *Neurobiol Aging*, **20**(1): 47-51.

Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. 2009. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex [J]. *Learn Mem*, **16**(5): 279-288.

Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ. 1991. Homology of the amyloid β protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta

amyloidosis in Alzheimer's disease [J]. *Am J Pathol*, **138**(6): 1423-1435.

Robledo P. 2010. Cannabinoids,opioids and MDMA: neuropsychological interactions related to addiction [J]. *Curr Drug Targets*, **11**(4): 429-439.

Sharp BM. 2006. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling [J]. *Brain Behav Immun*, **20**(1): 9-14.

Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R. 1981. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain [J]. *Acta Histochem* Suppl, **24**: 79-95.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. 2002. Role of Dopamine, the frontal cortex memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies [J]. *Neurobiol Learn Mem*, **78**: 610–624.

Wu YT, Liu HL, Chen XS. 2009. Distributions of CB1 and CB2-positive cells in adult rat’s brain [J]. *Chn J Rehab Med*, **24**(3): 197-199. [吴永涛, 刘宏亮, 陈兴书, 蔡其燕, 姚忠祥. 2009. 大麻素受体在成年大鼠脑组织中的分布特点. 中国康复医学杂志, **24**(3): 197-199.]

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 40−49 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01040

熊猴存在 *TRIM5*/*TRIMCyp* 杂合子基因型



曹 光[1,4], 佴文惠[2], 刘丰亮[1,4], 况轶群[1,4], 王金焕[2], 苏伟婷[2], 郑永唐[1,3,*]

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 3. 中国科学院昆明灵长类研究中心, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要：缺乏合适的动物模型是制约艾滋病研究取得重大突破的关键瓶颈之一。细胞内的抗病毒蛋白被称为限制因子。研究不同灵长类动物抗 HIV-1 宿主限制因子的存在形式及作用机制对建立合适 AIDS 灵长类动物模型有十分重要的意义。TRIM5α 是哺乳动物细胞中一种重要和关键的限制因子, 它以物种依赖的方式限制包括 HIV-1 在内的逆转录病毒的感染。*TRIM5-CypA* 融合基因是存在于新大陆猴与旧大陆猴中的一种独特的 *TRIM5* 基因形式。为了研究不同灵长类动物 *TRIM5* 基因的存在方式, 该文对熊猴、藏酋猴、红面猴及中国恒河猴 4 个物种共 110 只灵长类动物进行了 *TRIM5-CypA* 融合模式的研究。首次发现熊猴也存在 *TRIM5-CypA* 基因融合现象。熊猴 *TRIMCyp* 融合基因形成模式类似于北平顶猴 *TRIMCyp* 融合基因模式, 即 CypA 假基因的 cDNA 序列通过逆转座方式插入到 *TRIM5* 基因的 3'-UTR 区域。基因序列分析表明, 该基因与北平顶猴相应基因序列高度相似; 并且其 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点也相应存在 G-to-T 突变现象(G/T)。这提示熊猴也极有可能像北平顶猴一样表达 TRIM5-CypA 融合蛋白, 从而导致熊猴可能跟北平顶猴一样可能被 HIV-1 感染。因此, 熊猴极有希望成为一种新的 HIV/AIDS 灵长类动物模型。

关键词：熊猴; 限制因子; TRIM5α; *TRIM5-CypA* 融合基因; 杂合子基因型; HIV; 动物模型
中图分类号：R-332; Q959.848; R512.91 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0040-10

Identification of the *TRIM5*/*TRIMCyp* heterozygous genotype in *Macaca assamensis*

CAO Guang[1, 4], NIE Wen-Hui[2], LIU Feng-Liang[1, 4], KUANG Yi-Qun[1, 4], WANG Jin-Huan[2], SU Wei-Ting[2], ZHENG Yong-Tang[1, 3,*]

(1. *Key laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences &Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*; 2. *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution*, *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*; 3.*Kunming Primate Research Center of Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming*, *Yunnan* 650223, *China*; 4. *Graduate School of the Chinese Academy of Science*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: The lack of appropriate animal models that utilizes HIV-1 as the challenge virus is a major impediment to HIV/AIDS research. A major reason underlying the inability of HIV-1 to replicate in nonhuman primate cells is the existence of host antiviral restriction factors. The intrinsic antiviral proteins in host cells are described as restriction factors. The understanding of restriction factors and their mechanism in different primates would undoubtedly facilitate the development of HIV/AIDS animal models. TRIM5α is an important restriction factor and can restrict the infection of several retroviruses including HIV-1 in a species-specific fashion. *TRIM5-cyclophilin A* (*TRIMCyp)* gene is an unusual *TRIM5* locus found in New World and Old World monkeys. The different *TRIMCyp* genotypes of four primates (110 samples) including assam macaque (*Macaca assamensis*), tibetan macaque (*M. thibetana*), stump-tailed macaque (*M. arctoides*) and Chinese rhesus macaques (*M. mulatta*) were studied in this paper. We firstly found that *TRIM5-CypA* fusion gene exist in *M. assamensis*. The *TRIMCyp* of *M. assamensis* also results from the retrotransposition of CypA pseudogene cDNA into 3'-UTR of *TRIM5* gene like *TRIMCyp* of *M. leonina*. Moreover, there is an extremely high

收稿日期：2010-12-01; 接受日期：2010-12-30
基金项目：国家重点基础研究发展计划(“973”) (2006CB504302); 国家自然科学基金(U0832601,30671960); 国家科技重大专项“十一五”计划 (2009ZX09501-029); 中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-EW-R-13）资助
*通讯作者(Corresponding author), 郑永唐, Tex/Fax: 0871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：曹 光, 男, 硕士研究生, 主要从事 TRIM5α限制 HIV-1 复制机制的研究

sequence homology between *TRIMCyp* genes from *M. assamensis* and *M. leonina*. Besides, we also found the G-to-T mutation (G/T) in the 3'splicing site of *TRIM5* intron 6, which was identical to *M. leonina*. These results indicate *M. assamensis* may also encode TRIMCyp protein like *M. leonine*, which imply *M. assamensis* might be infected by HIV-1. Therefore, it is very possible that *M. assamensis* will be used as a new HIV/AIDS animal model.

Key words: *Macaca assamensis*; Restriction factor; *TRIM5α; TRIMCyp*; Heterozygous genotype; HIV; Animal model

艾滋病，又称为获得性免疫缺陷综合症(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)，是一种由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染引起的致死性传染病。HIV 病毒属于逆转录病毒科慢病毒属，是一种 RNA 病毒。AIDS 严重威胁人类健康和影响经济发展，加强 HIV/AIDS 预防、诊断及治疗的基础和应用研究刻不容缓。缺乏理想或合适的动物模型是制约艾滋病研究取得重大突破的关键瓶颈之一，宿主病毒限制因子(restriction factor)的存在则是无法建立理想或合适 HIV/AIDS 动物模型的重要原因之一。

病毒与其宿主在进化过程中已共存数百万年。病毒通过基因突变等方式逃避宿主的防御体系，以利于病毒自身的复制和生存。宿主在进化过程中也发展了多种形式的天然免疫和特异性免疫系统，以抑制病毒在体内的复制，清除体内病毒及病毒感染的细胞，以利于宿主自身的生存。细胞内的抗病毒蛋白被称为限制因子。通过一些天然免疫分子或限制因子来限制病毒的复制是灵长类宿主抗病毒机制的重要组成部分。在灵长类的基因组中，有一些基因编码具有抗病毒作用的天然免疫分子，在宿主抗病毒感染中具有重要作用。近年来，已有多个宿主抗病毒限制因子被陆续发现，如 APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptides) (Sheehy et al, 2002)、ZAP (zinc-finger antiviral protein) (Gao et al, 2002)、TRIM5α (tripartite motif protein 5α) (Stremlau et al, 2004)、TRIM28 (Wolf & Goff, 2007)和 Tetherin (Neil et al, 2008)等，它们共同形成固有免疫(intrinsic immune)体系的崭新内容(Bieniasz, 2004)。宿主抗病毒限制因子为人们研究逆转录病毒的发病机制和抗病毒策略提供了全新的思路，其研究是 AIDS 防治研究的热点和前沿领域之一。不同灵长类动物尤其是中国产灵长类动物抗 HIV-1 宿主限制因子的存在形式、多态性和对 HIV-1 的限制作用研究将对建立合适的新型 AIDS 灵长类动物模型有十分重要的意义。

TRIM5α 是哺乳动物细胞中一种十分重要和关键的限制因子，它以一种物种依赖的方式限制包括 HIV-1 在内的逆转录病毒的感染 (Tang et al, 2009)。TRIM5α分子是三重模体蛋白大家族的成员。TRIM 家族蛋白又称 RBCC 蛋白，因所有 TRIM 蛋白均具有 3 个结构域 RING、B-box(es)和 Coiled-coil 而得名(Towers, 2007)。TRIM5α是 TRIM5 转录产物中最长的选择性剪接体，它相比其他 TRIM5 分子(TRIM5β、γ、δ、ε) (Xu et al, 2003)及其他 TRIM 蛋白家族成员在 C 末端多了 1 个 B30.2/SPRY(SPla and RYanodine) 结构域 (Stremlau et al, 2004) (图 1)。TRIM5 同源物不仅广泛存在于包括人、猿、旧大陆猴(Old World monkey)及新大陆猴(New World monkey)等多种灵长类谱系中(Sawyer et al, 2005; Song et al, 2005)，而且在其他哺乳动物，如牛(Si et al, 2006; Ylinen et al, 2006)和兔子(Schaller et al, 2007)等中也存在。由于 TRIM5α分子的存在和作用，绝大部分旧大陆猴都不能感染 HIV-1。

在新大陆猴中，鹰猴 (owl monkeys, *Aotus*)是惟一不被 HIV-1 感染的灵长类动物。研究发现，鹰猴细胞中存在一个独特的 *TRIM5* 基因形式，即 1 个 LINE-1(long interspersed nuclear element 1)逆转座子(retrotransposon)催化一个 *CypA* (Cyclophilin A)假基因的 cDNA 序列通过逆转座的方式插入到 *TRIM5α*基因的第 7 和第 8 外显子之间的内含子中，从而形成 TRIM5-CypA 融合基因(Sayah et al, 2004; Nisole et al, 2004)(图 1)。由于细胞内的 CypA 能够结合 HIV-1 衣壳蛋白(capsid)(Luban et al, 1993; Franke et al, 1994; Thali et al, 1994)，鹰猴表达的 TRIMCyp 融合蛋白(owl monkey TRIM5-CypA, *omTRIMCyp*)可以通过其 CypA 结构域与进入细胞的病毒衣壳相互作用，从而抑制 HIV-1 的复制(Diaz-Griffero et al, 2006; Zhang et al, 2006; Li et al, 2007)。*omTRIMCyp* 融合基因的同源物存在于鹰猴属 (genus *Aotus*)的许多物种中(Ribeiro et al, 2005)，但是在其他灵长类谱系及新大陆猴的其他属中均未被发现(Sayah et al, 2004; Ribeiro et al, 2005)。

在旧大陆猴中，平顶猴是惟一报道可以感染

HIV-1 的动物。我们在对平顶猴群体(*M.nemestrina* group)的北平顶猴(northern pig-tailed macaque, *M. leonina*)进行研究时，首次发现其存在着与鹰猴相似的 *TRIM5-CypA* 融合基因现象，我们将该融合基因命名为 *npmTRIMCyp*，但其基因融合模式和表达剪接方式与鹰猴不同 (Liao et al, 2007) (图 1)。随后国际上多个实验室证实了我们的实验结果并随后也分别在平顶猴、食蟹猴(*M. fascicularis*)和印度恒河猴中发现了这种 *TRIM5-CypA* 融合基因，这些融合基因均由 *CypA* 基因通过 LINE-1 介导的逆转座方式插入到 *TRIM5* 基因的 3'端或下游形成，它们均能经转录翻译产生由 *TRIM5* 的第 2～6 外显子和完整 CypA 结构域组成的 TRIMCyp 蛋白(图 1)，这些蛋白均不能限制 HIV-1 的感染(Liao et al, 2007; Brennan et al, 2008; Newman et al, 2008; Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008)，但是具有限制 HIV-2、FIV 或 EIAV 的活性(Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008; Kuang et al, 2009)。有研究表明，平顶猴 TRIMCyp 融合蛋白不能限制 HIV-1 是由于 CypA 结构域的一个 R69H 单氨基酸突变造成的(Virgen et al, 2008; Kuang et al, 2009)。在北平顶猴 npmTRIMCyp 融合蛋白中也发现了该 R69H 氨基酸突变，可能这也是造成 npmTRIMCyp 融合蛋白不能限制 HIV-1 的原因。HIV-1 也能感染猕猴属 *TRIMCyp* 纯合基因型的北平顶猴外周血单核细胞(PBMC) (Kuang et al, 2009)，并且含 *SIV vif* 基因(用以克服猴另一 HIV-1 限制因子 APOBEC3G 的阻碍)的重组猴嗜性 HIV-1(stHIV-1)能短期内感染平顶猴(Hatziioannou et al, 2009)。这些结果表明，纯合 *TRIMCyp* 基因型的北平顶猴可能支持 HIV-1 的有效复制，有望成为 HIV-1 感染的新型模型动物。

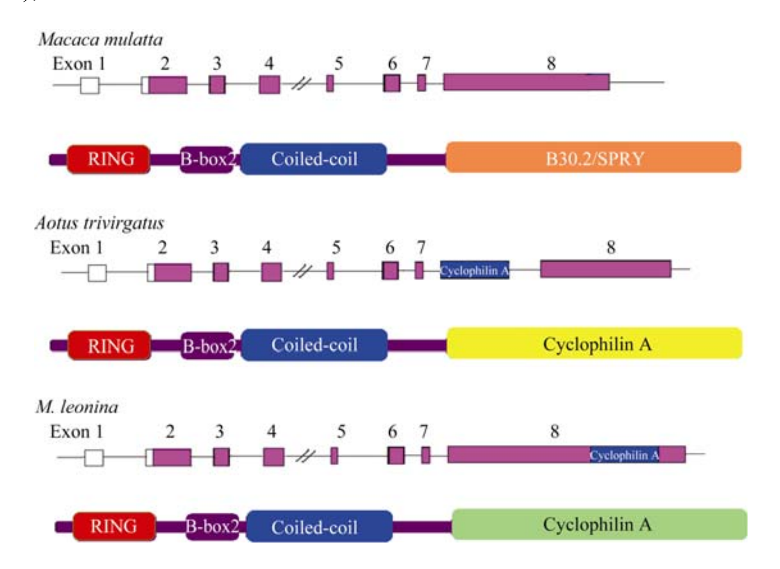


图 1 灵长类动物的 *TRIM5/TRIMCyp* 基因和蛋白结构示意图

Fig. 1 The schematic genomic and protein structures of primate *TRIM5/TRIMCyp*

Macaca mulatta: 恒河猴 (rhesus macaque); *Aotus trivirgatus*: 鹰猴 (owl monkey); *M. leonina*: 北平顶猴(northern pig-tailed macaque)。

鹰猴 *omTRIMCyp* 融合基因和北平顶猴 *npmTRIMCyp* 融合基因是目前在灵长类动物中发现存在的两种不同 *TRIM5-CypA* 基因融合模式，两者分别在天然宿主因子限制 HIV-1 复制机制研究及建立新型艾滋病灵长类动物模型方面发挥着不同的重要作用。灵长类动物种属繁多，资源丰富，但对其中许多动物的 *TRIMCyp* 基因型并不清楚，有必要进行进一步的检测。本研究检测了熊猴、藏酋猴、红面猴及中国恒河猴是否存在鹰猴 *omTRIMCyp* 及北平顶猴 *npmTRIMCyp* 两种不同的 *TRIM5-CypA* 基因融合模式，以期发现类似于两者或者全新的 *TRIM5-CypA* 融合基因存在形式，为人们研究艾滋病发病机制及寻找适合建立 HIV 感染艾滋病模型的灵长类动物提供重要依据。

1 材料与方法：

1.1 研究材料

本研究共包括熊猴(Assam macaque, *Macaca assamensis*)、藏酋猴(Tibetan macaque, *M. Thibetana*)、红面猴(stump-tailed macaque, *M.*

arctoides)及中国恒河猴(Chinese rhesus macaques, *M. mulatta*) 4 种灵长类动物共 110 个个体，其中 14 个熊猴个体, 2 个藏酋猴个体, 8 个红面猴个体, 86 个中国恒河猴个体。实验用样本为采自这 110 只动物的组织或血液样本，样本名称、类型、产地等信息见表 1。北平顶猴基因组 DNA 为本实验室 –80℃保存样品。

表 1　研究所用灵长类动物样本
Tab. 1　The samples of primates in the present study

物种名 Species	样本编号 Symbols of individuals	个体数 Sample size	样本类型 Sample type	产地 Locality
熊猴 *Macaca assamensis*	M.assVm	1	组织 Tissue	越南西贡 Sài Gòn Vietnam
	M.assYL1−M.assYL2	2	组织 Tissue	云南云龙 Yunlong, Yunnan
	M.assUk	1	组织 Tissue	未知 Unknown
	M.assY1	1	组织 Tissue	云南 Yunnan
	M.assY2−M.assY10	9	血液 Blood	云南 Yunnan
藏酋猴 *M.thibetana*	M.thiS	1	组织 Tissue	四川 Sichuan
	M.thiUk	1	组织 Tissue	未知 Unknown
红面猴 *M. arctoides*	M.arcYK	1	组织 Tissue	云南河口 Hekou, Yunnan
	M.arcYH1−M.arcYH2	2	组织 Tissue	云南黄连山 Huanglianshan, Yunnan
	M.arcH	1	组织 Tissue	湖北恩施 Enshi, Hubei
	M.arcY1−M.arcY4	4	血液 Blood	云南 Yunnan
中国恒河猴 *M. mulatta*	M.mulY1−M.mulY86	86	血液 Blood	云南 Yunnan

1.2　基因组 DNA 的提取

动物样本基因组 DNA 提取按 Qiagen 公司 Puregene blood core kit B 及上海华舜生物技术有限公司的柱式小量组织/细胞基因组 DNA 抽提试剂盒推荐方法进行。提取的基因组 DNA −20℃保存备用。

1.3　PCR 检测类似北平顶猴 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)存在形式片段

参照已发表恒河猴基因组 14 号染色体序列(Genbank no. NC_007871.1)，经序列分析找到北平顶猴 CypA 插入 *TRIM5* 的大致位置，在此插入位置两端，即 *TRIM5* intron 7 内部设计上游引物 P8F：5'-TCTGAACAAGTTTCCTCCCA-3', *TRIM5* exon8 3'-UTR 后端设计下游引物 P8R：5'-TAGTTTCCCTGAAGGCACAA-3'，利用此对引物进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μL，以 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 为模板。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 50.3 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2.5 min, 共 30 个循环；最后在 72 ℃延伸 10 min。Taq-PCR 及 Ex Taq-PCR 试剂盒购自 Takara 公司。

1.4　PCR 检测类似鹰猴 *TRIMCyp*(*omTRIMCyp*)存在形式片段

参照已发表恒河猴基因组 14 号染色体序列(Genbank no. NC_007871.1)，经序列分析找到鹰猴 CypA 插入 *TRIM5* 的大致位置，在此插入位置两端即 *TRIM5* intron 6 内部及 exon8 的 5'端，利用引物 T5in6F1 和 T5ex8R3(Kuang et al, 2009)进行 PCR 扩增。PCR 反应的总体积为 25 μL，用 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 为模板。PCR 反应条件为：94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58.5 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环；最后在 72 ℃延伸 7 min。Taq-PCR 及 Ex Taq-PCR 试剂盒购自

Takara 公司。

1.5 PCR 产物克隆及测序分析

根据 1.3 节及 1.4 节 PCR 检测结果, 各选取部分 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳纯化，Gel Extraction Mini Kit (上海华舜生物技术有限公司)回收后克隆至 pMD 19-T simple Vector (Takara), 转化感受态 *E.coil* DH5α, 利用氨苄青霉素抗性筛选并挑取单克隆后, 送公司测序。测序结果应用 DNAStar Megalign、Bioedit 及 DNAssist 等程序进行序列比对与分析。

1.6 *Nsi*I 酶切反应检测 TRIM5 内含子 6 的 3'-剪接位点 G-to-T 突变

根据 1.4 PCR 检测结果, 选取部分 PCR 产物, 利用限制性内切酶 *Nis*I (Fermentas 公司) 进行酶切反应, 酶切产物经 1.4%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结 果

2.1 熊猴 *TRIM5*/*TRIMCyp* 杂合子基因型的发现及其 *TRIMCyp* 形成方式分析

我们对 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 进行了类似北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)存在形式片段的 PCR 检测。根据设计, 使用引物 P8F 和 P8R 进行 PCR 扩增时, 含有类似北平顶猴 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)存在形式片段的猴个体样本将被扩增产生 1 条 2.8 kb 左右的 DNA 片段; 而不含有上述存在形式片段, 但只存在 *TRIM5* 的猴个体样本将被扩增出 1 条 2.0 kb 左右的 DNA 片段。检测结果显示：4 种灵长类动物 110 个猴个体样本中, 藏酋猴、红面猴及恒河猴样本均只产生 1 条 2.0 kb 左右的 DNA 片段(图 2), 表明这 3 种猴个体均只存在 *TRIM5α*。在对 14 个熊猴样本的检测中, 发现分别来自越南西贡和中国云南的 2 只熊猴(A1 和 A2)样本出现了 2.8 kb 左右及 2.0 kb 左右的双重条带, 并且其 2.8 kb 左右条带与北平顶猴样本扩增出的 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)条带大小相一致(图 2)。提示这 2 只熊猴个体可能呈现 *TRIM5*/ *TRIMCyp* 杂合子基因型。

在藏酋猴、红面猴及恒河猴样本, 各选取了部分样本的 PCR 产物, 进行了胶回收, 纯化后 TA 克隆, 对新发现的产生双重条带的 2 只熊猴样本及只产生 1 条 2.0 kb 左右条带的熊猴样本中的部分样本, 也进行了 PCR 产物的回收, 纯化及 TA 克隆, 然后将克隆样本送公司测序后发现, 上述 2 只熊猴产生的双重条带中, 2.8 kb 左右的条带即为 *TRIMCyp*, 而 2.0 kb 左右的条带即为 *TRIM5α*, 其它只产生 1 条 2.0 kb 左右条带的猴样本均只存在 *TRIM5α*。

对 2 只熊猴(A1 和 A2)样本的 *TRIMCyp* 片段进行序列分析后发现, 其 *CypA* 假基因均插入至 *TRIM5* 基因座的 3'-UTR 区域, 并且 *CypA* 假基因两端均存在靶位点重复序列(target site duplication, TSD), 这与 LINE1 元件介导的逆转录转座特征序列相同, 可见其 *TRIM5-CypA* 融合基因的形成方式与北平顶猴 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)的形成方式相似(图 3)。基因序列分析表明, 该融合基因与北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)高度同源。2 只熊猴(A1 和 A2)样本的 *TRIMCyp* 序列结果已提交 NCBI GenBank, 获得的序列号(accession numbers)分别为 HQ602649 及 HQ602650。

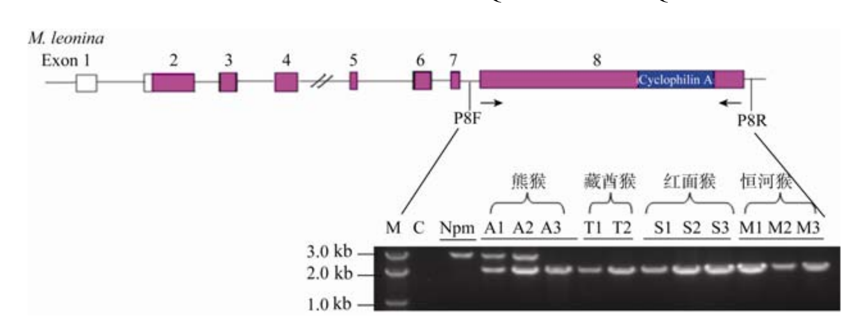


图 2 PCR 检测类似北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)存在形式片段

Fig. 2 PCR amplification of fragments like *npmTRIMCyp*

引物 P8F 与 P8R 扩增类似 *npmTRIMCyp* 基因片段产物为 2.8 kb 左右, 扩增 *TRIM5* 基因片段产物为 2.0 kb 左右; M：DNA 标记; C：H_2O; Npm：北平顶猴; A1(M.assVm), A2(M.assY9), A3：熊猴; T1,T2：藏酋猴; S1, S2, S3：红面猴; M1, M2, M3：中国恒河猴。

Reactions with P8F/P8R primer pair generated about a 2.8kb fragment of *TRIM5-CypA* locus like *npmTRIMCyp* and a 2.0kb fragment of *TRIM5* locus. M: DNA marker. C: H_2O. Npm: Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*).A1(M.assVm), A2(M.assY9), A3: *M. assamensis*. T1,T2: *M.Thibetana*. S1, S2, S3: *M. arctoides*. M1, M2, M3: Chinese *M. mulatta*.

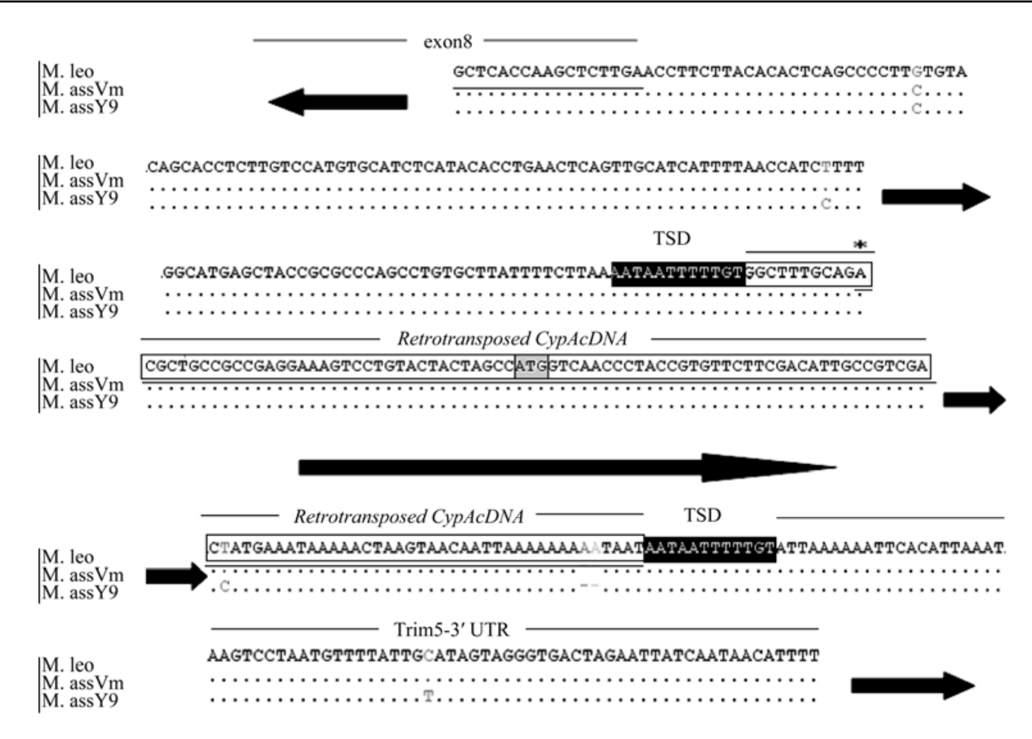


图 3　北平顶猴与熊猴 *TRIMCyp* 融合基因序列比对及基因结构比较

Fig. 3　Sequence alignment and genomic structure comparison of *TRIMCyp* gene of *Macaca leonina* and *M. assamensis*

M.leo：北平顶猴 *TRIMCyp* 融合基因; M.assVm 及 M.assY9：熊猴 *TRIMCyp* 融合基因; 深色阴影区域表示 TSD 序列; 星号标注的核苷酸：CypA 转录拼接 5'起始点; 黑色框：逆转座插入的 CypA cDNA; 浅色阴影区域：CypA 假基因翻译起始位点; 下划线基因序列：外显子; 无下划线基因序列：内含子。

M.leo: *npmTRIMCyp*. M.assVm 及 M.assY9: *TRIMCyp* of *Macaca assamensis*. The 12-bp target site duplication (TSD) is shaded and highlighted in black. The asterisk (*) meaned splice acceptor. The black frame showed the inserted CypA cDNA sequence. The‘natural’CypA start codon is shaded and highlighted in gray. The exons of *TRIMCyp* and the *TRIM5* exon8 are underlined. The introns are not underlined.

2.2　PCR 检测类似鹰猴 *TRIMCyp*(*omTRIMCyp*)存在形式片段及测序验证

我们又对 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 进行了类似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*)存在形式片段的 PCR 检测。根据设计，使用引物 T5in6F1 和 T5ex8R3 进行 PCR 扩增时，含有类似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*)存在形式片段的猴个体样本将被扩增产生 1 条 1.5 kb 左右的 DNA 片段，而不含有上述存在形式片段的猴个体样本将被扩增出 1 条 705 bp 左右的 DNA 片段。检测结果显示：4 种灵长类动物 110 个猴个体样本均只产生 1 条 705 bp 左右的条带(图 4)，表明这些猴个体均不存在类

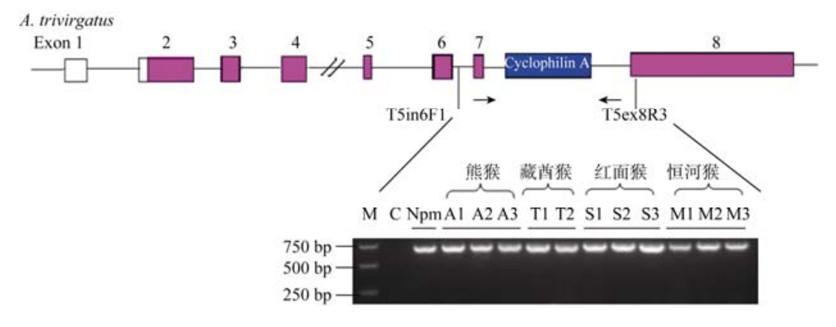


图 4　PCR 检测类似鹰猴 *TRIMCyp*(*omTRIMCyp*)存在形式片段

Fig. 4　PCR amplification of fragments like *omTRIMCyp*

引物 T5in6F1 与 T5ex8R3 扩增类似 *omTRIMCyp* 基因片段产物为 1.5 kb 左右，扩增 *TRIM5* 基因片段产物为 705b p 左右。M：DNA 标记; C：H_2O; Npm：北平顶猴; A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 同图 2。

Reactions with T5in6F1/ T5ex8R3 primer pair generated about a 1.5 kb fragment of *TRIM5-CypA* locus like *omTRIMCyp* and a 705 bp fragment of *TRIM5* locus. M: DNA marker. C: H_2O. Npm: Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*). A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 as described in Fig. 2.

似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*)融合形式。然后, 我们在 4 种灵长类动物样本中, 各选取了部分样本的PCR产物, 进行了胶回收, 纯化后TA克隆, 最后将克隆样本送公司测序, 测序结果证实了上述结论。

2.3 *TRIM5*内含子6的3′-剪接位点G-to-T突变检测

在内含子6上游的1个限制性内切酶*Nis*I 的酶切位点的突变和 3'-剪接位点的突变在染色体遗传上是紧密连锁的。由于该3'-剪接位点的突变可以阻止或降低 *TRIM5* 表达形成α异构体即 TRIM5α, 从而致使其可能与CypA插入 *TRIM5*3'-UTR直接相关(Newman et al, 2008; Liao et al, 2007)。我们前期研究发现, 在北平顶猴融合基因 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)的2个主要转录剪接体中, *TRIM5* 的外显子 7 和 8 均被选择性地剪接删除(Liao et al,2007)。对造成该结果的原因进行分析后发现其可能也与3'-剪接位点的突变有关。我们通过对 11 只北平顶猴样本和2个中国恒河猴样本进行PCR扩增包含内含子 6 的 1 个片段, 然后, 通过限制性内切酶 *Nis*I 酶切分析该片段的大小及对扩增的 PCR 产物进行测序后发现, 在所有北平顶猴 *TRIM5* 内含子6的3'-剪接位点均存在G-to-T突变, 而作为对照的中国恒河猴样本的 PCR 产物均没有发现该突变位点的存在。这很好地解释了 *TRIM5* 的外显子 7 被选择性地剪接删除的原因, 但在内含子 7 中却没有检测到类似的 3'-剪接位点突变存在。因此, 外显子 8 被转录剪接删除的具体机制不明(Kuang et al, 2009)。

由于“结果 2.2 节”中进行 PCR 检测的引物T5in6F1和T5ex8R3与我们前期研究中进行PCR扩增所用的引物相同。因此, “结果 2.2 节”中所得到的PCR产物即为包含内含子6的1个片段, 大小为 705 bp。本实验中选取了“结果 2.2 节”中那部分进行了 TA 克隆及测序的 PCR 产物, 并对其进行了限制性内切酶 *Nis*I 的酶切反应。结果发现, 2 只熊猴样本(A1和A2)经*Nis*I酶切后, 产生3条带, 其中2条带大小分别为460 bp和245 bp, 与上述我们的前期研究工作中北平顶猴样本的酶切产物一致, 而另 1 条带大小仍为 705 bp, 只是条带亮度较酶切前变暗。而其他灵长类动物样本的 PCR 产物经 *Nis*I 酶切后, 均未发生变化, 仍保持其 705 bp 的片段大小及亮度(图 5A)。以上结果提示我们, 这 2 只熊猴样本(A1和A2)可能在其 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点的G-to-T突变上存在杂合现象, 而其他灵长类动物样本则可能不存在该位点突变。

为了进一步证实该结果, 我们对酶切前PCR产物的 TA 克隆样本的测序结果进行了序列分析。证明在这 2 只熊猴样本(A1 和 A2)的 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点的 G-to-T 突变上确实存在杂合现象, 而其他灵长类动物样本没有发现该位点存在突变(图 5B)。

3 讨 论

3.1 熊猴地理分布及亚种分析

熊猴(Assam Macaque, *Macaca assamensis*)是一种产于印度、尼波尔、越南以及中国云南、广西、西藏等地区的灵长类猕猴属动物。熊猴主要分为东熊猴(eastern Assamese macaque, *M. assamensis assamensis*)和西熊猴(western Assamese macaque, *M. assamensis pelops*) 2 个亚种(Groves, 2001)。东熊猴主要分布在不丹、中国西南部(广西、贵州、西藏、云南)、印度东北部、老挝北部、缅甸、泰国西北部及越南北部等地区。西熊猴主要分布在孟加拉国、不丹、印度北部和尼泊尔等地区 (Groves, 2001)。本研究中所用熊猴样本来自越南西贡和中国云南, 从熊猴亚种的地理分布上观察, 我们取样的这些熊猴可能同属于东熊猴这个亚种, 因而其基因组水平差异可能较小。对这些熊猴样本进行类似北平顶猴 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*) 及类似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*) 2 种不同的 *TRIM5-CypA* 基因融合模式检测, 我们首次发现分别来自越南西贡和中国云南的 2 只熊猴样本 (M. assVm 及 M. assY9)(表 1)均存在 *TRIM5*/*TRIMCyp* 杂合子基因型, 并且二者序列同源性很高。这也从基因水平上支持了我们用于本研究的这些熊猴可能同属于一个亚种的结论。

3.2 *TRIM5/TRIMCyp*杂合子基因型在灵长类动物中的存在情况及其所占比例分析

在新大陆猴的鹰猴中, *TRIM5-CypA* 融合基因均以 *TRIMCyp* 纯合子基因型存在, 不存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型。在旧大陆猴中, *TRIM5-CypA* 融合基因的存在形式及比例具有一定的种间差异。Newman et al (2008) 对 101 只印度恒河猴及16只平顶猴样本进行*TRIM5-CypA*融合基因检测后发现, 101 只印度恒河猴样本中, 有 17 个样本存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 其中 16 个样本为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型, 1 个样本为 *TRIMCyp* 纯合子基因型, *TRIM5-CypA* 融合基因存在比例约为 17%, 其中 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基

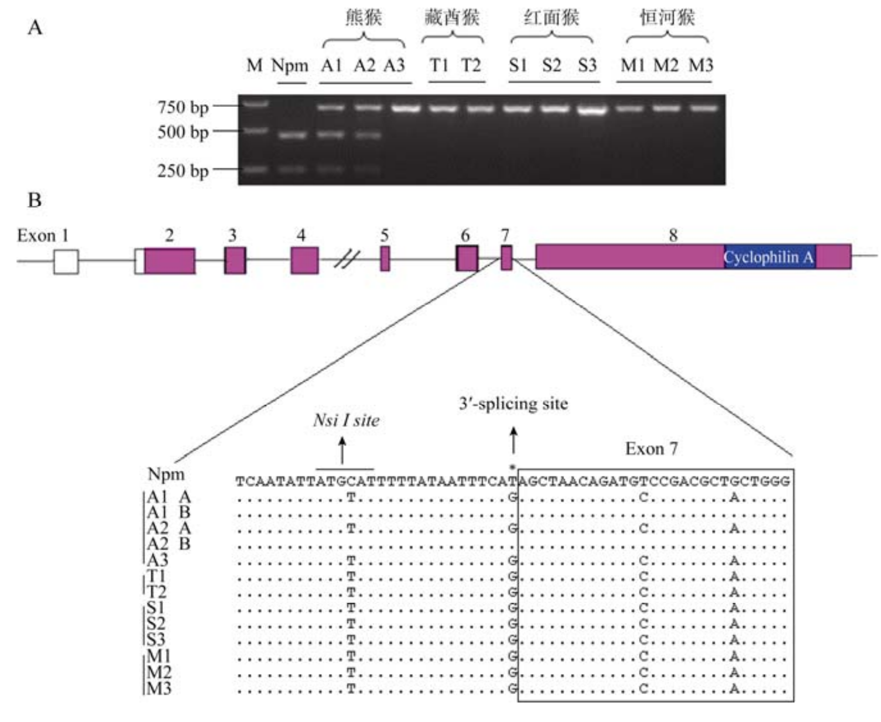


图 5　*TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点突变分析

Fig. 5　Analysis the G-to-T mutation in the 3'-splicing site of *TRIM5* intron 6

A) 限制性内切酶 *Nis*I 酶切 PCR 产物电泳检测内含子 6 中 3'-剪接位点的突变。M：DNA 标记；Npm：北平顶猴；A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 同图 2；B) 测序分析内含子 6 中 3'-剪接位点的突变。A1 (A, B)，A2 (A, B)分别表示样本 A1 和 A2 的不同克隆。A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 同图 2。黑框表示 *TRIM5* 的外显子 7；星号表示 3'-剪接位点；划线区域表示 *Nis*I 识别序列。

A) The PCR products were digested with restriction endonuclease *Nsi*I, followed by electrophoresis in agarose gel. M: DNA marker. Npm: Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*). A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 as described in Fig. 2; B) Sketch map and sequence of 3'-splicing site in *TRIM5* intron 6. A1 (A, B), A2 (A, B) represents the different TA clones of A1 and A2. A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 as described in Fig. 2. The boxes represent the exon7 of the *TRIM5* genome, and the lines represent the introns. The 3'-splicing site is indicated by the asterisk (*), and the *Nsi*I recognition sequence is lined.

因型占总的 *TRIM5-CypA* 融合基因比例约为 94%。而 16 只平顶猴样本均存在 *TRIM5-CypA* 融合基因，且皆为 *TRIMCyp* 纯合子基因型(Newman et al, 2008)。本实验室及国际上多个实验室在对北平顶猴、平顶猴及食蟹猴的 *TRIM5-CypA* 融合基因进行检测后，也都发现所有研究样本均存在 *TRIM5-CypA* 融合基因，且皆为 *TRIMCyp* 纯合子基因型(Liao et al, 2007; Brennan et al, 2008; Kuang et al, 2009)。Wilson et al (2008)在对 31 只印度恒河猴及 38 只中国恒河猴样本进行 *TRIM5-CypA* 融合基因检测后发现，31 只印度恒河猴样本中，16 个样本存在 *TRIM5-CypA* 融合基因，其中 15 个样本为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型，1 个样本为 *TRIMCyp* 纯合子基因型，*TRIM5-CypA* 融合基因存在比例约为 51.6%，其中 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型占总的 *TRIM5-CypA* 融合基因比例约为 94%，而 38 只中国恒河猴样本均不存在 *TRIM5-CypA* 融合基因。由此可见，*TRIMCyp* 纯合子基因型可能主要存在于鹰猴和平顶猴群体中，并在这 2 个物种中得以固定并稳定遗传。由于受到地理环境因素及古代逆转录病毒选择压力的影响，*TRIM5-CypA* 融合基因在印度恒河猴中以一定比例存在，并且保持 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型占绝大多数，而中国恒河猴则不存在 *TRIMCyp* 基因，并且这种现象也可能在猕猴属的其他物种中存在。

本研究首次在 14 只熊猴样本中发现了 2 个样本存在 *TRIM5-CypA* 融合基因，且均为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型，*TRIM5-CypA* 融合基因存在比率为 14%，而在包括中国恒河猴在内的其他 3 种灵长类动物中均未发现以任何形式存在的 *TRIM5-CypA* 融合基因，这与上述其他实验室对印度恒河猴和中国恒河猴的研究结果较为相似。当然，由于本研究所涉及的 4 种灵长类动物数量有限，且产地不一。因此，还不能确定是否熊猴存在 *TRIMCyp* 纯合子基因型及其所占比例，也还不能确定其他 3 种灵长类动物是否真正不存在 *TRIM5-CypA*

融合基因。

3.3 *TRIM5* 内含子 6 3'-剪接位点的突变可能与 CypA 插入 *TRIM5* 3'-UTR 直接相关

国际上多个实验室先后发现在平顶猴和印度恒河猴的 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点, 存在 G-to-T 的单核苷酸突变现象, 并且认为该突变可能与其下游 exon7 的缺失有关(Brennan et al, 2007; Wilson et al, 2008)。Newman et al (2008)在对印度恒河猴 *TRIM5* 基因座进行测序时也发现其内含子 6 的3'-剪接位点存在G-to-T突变, 并认为该突变可能会干扰 mRNA 的剪接过程。同时, 还发现在该突变位点上游 16 个核苷酸处偶联了另一个能够产生 *Nsi*I 限制性核酸内切酶识别位点的单核苷酸突变。于是, 他们利用 PCR 及 *Nsi*I 酶切反应对 101 只印度恒河猴及 16 只平顶猴样本进行 3'-剪接位点的 G-to-T 突变检测, 发现在 101 只印度恒河猴样本中, 84 个样本无 G-to-T 突变(G/G), 16 个样本存在 G-to-T 突变杂合现象(G/T), 1 个样本存在 G-to-T 突变纯合现象(T/T)。16 只平顶猴样本则均为纯合的 G-to-T 突变(T/T)。通过对上述所有样本进行 *TRIM5-CypA* 融合基因检测后发现, 3'-剪接位点的 G-to-T 突变存在与否及其存在形式与其 *TRIM5*3'-UTR 是否存在 CypA 插入现象及其形成的 *TRIM5-CypA* 融合基因的基因型密切相关, 即(G/G)对应 *TRIM5α* 纯合子, (G/T)对应形成 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子, (T/T)对应形成 *TRIMCyp* 纯合子。我们在 11 只北平顶猴样本中, 也发现存在 G-to-T 突变及 CypA 插入 *TRIM5*3'-UTR 现象, 并且所有 11 个样本均为纯合的 G-to-T 突变(T/T)及对应形成 *TRIMCyp* 纯合子(Kuang et al, 2009)。由此可见, *TRIM5* 内含子 6 中 3'-剪接位点的纯合 G-to-T 突变(T/T)及对应形成的 *TRIMCyp* 纯合子均在平顶猴群体中得以固定并稳定遗传。本论文研究中, 通过 PCR/*Nsi*I 酶切反应及测序对 4 种灵长类动物共 110 个样本 *TRIM5* 内含子 6 中 3'-剪接位点的突变进行检测后发现, 在 14 只熊猴样本中, 有 2 个样本(M.assVm 及 M.assY9)存在 G-to-T 突变杂合现象(G/T), 而且其 *TRIM5* 3'-UTR 也对应有 CypA 插入现象且形成 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子。这与上述 Newman et al (2008)在 16 个印度恒河猴样本中发现的结果相一致。而其他 108 个样本均既无 G-to-T 突变(G/G), 也不形成 *TRIM5-CypA* 融合基因, 而只存在 *TRIM5α*。

综上所述, 我们发现 *TRIM5* 内含子 6 3'-剪接位点的突变与 CypA 插入 *TRIM5*3'-UTR 密切相关, 并且两者的存在形式相互对应。因此可通过检测 *TRIM5* 内含子 6 中 3'-剪接位点的突变及其存在形式来预测其是否存在类似北平顶猴模式的 *TRIM5-CypA* 融合现象及其形成的融合基因的基因型。当然, 还有许多问题有待进一步研究, 诸如: *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点突变与 CypA 插入 *TRIM5* 3'-UTR 是否存在必然联系, 若存在, 两者的因果关系如何, 为什么两者可以在同一个物种中同时被固定下来并表现为相对应的基因型。

3.4 熊猴 *TRIMCyp* 主要转录剪接体及 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子功能预测

之前有很多研究表明, 在平顶猴及印度恒河猴的 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点的 G-to-T 突变可能会干扰 mRNA 的剪接过程, 从而导致 *TRIM5* 外显子 7 的缺失(Brennan et al, 2007; Wilson et al, 2008; Kuang et al, 2009)。本研究中存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型的 2 只熊猴样本(A1 和 A2), 其 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点的 G-to-T 突变上也存在(G/T)杂合现象, 这暗示熊猴(A1 和 A2)融合基因 *TRIMCyp* 在其形成主要转录剪接异构体的转录剪接过程中, 可能其 *TRIM5* 的外显子 7 也会像北平顶猴一样被选择性地剪切删除。同样, 我们对外显子 8 被转录剪接删除的原因也进行了分析, 但在内含子 7 中没有检测到类似的 3’-剪接位点突变存在, 这与我们前期研究工作中对北平顶猴内含子 7 的检测结果相一致(Kuang et al, 2009)。因此, 其外显子 8 是否会像北平顶猴一样被选择性地剪切掉, 如果能被剪切掉, 那么产生该现象的具体机制又是如何? 另外, 由于北平顶猴 *npmTRIMCyp* 不能够限制 HIV-1 的复制, 可能主要是由于其外显子 7 的缺失造成的。因此推测, 熊猴(A1 和 A2)融合基因 *TRIMCyp* 可能也不能够限制 HIV-1 的复制。而大多数旧大陆猴由于其 TRIM5α分子的作用使其都不能感染 HIV-1, 熊猴属于旧大陆猴的成员, 因此其 TRIM5α分子也可能限制 HIV-1 的复制, 但是否确实如此还未见报道。本研究首次在熊猴中发现存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 并进一步确定其为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型, 但是具有该基因型的熊猴能否限制 HIV-1 或其他逆转录病毒的复制? 若能限制, 其具体机制如何? 其 TRIM5α蛋白和 TRIMCyp 蛋白在限制病毒复制过程中各自发挥的

作用是什么？这些问题还有待进一步的研究。

TRIMCyp 纯合子基因型的北平顶猴对 HIV-1 易感, 并且其作为 HIV-1 感染动物模型已经取得了较好的研究结果, 但数量有限。据调查, 熊猴的野外种群数量较北平顶猴多, 并且在中国云南及东南亚一带分布较广, 易于进行繁殖和驯化。如果本研究中发现存在 *TRIM5*/*TRIMCyp* 杂合子基因型的熊猴能够对 HIV-1 稳定易感, 那么它将有望成为新型的 HIV-1 感染艾滋病灵长类动物模型, 对艾滋病的预防和治疗及体内 HIV-1 感染和复制机制研究发挥重要作用。

致谢：感谢本所灵长类实验动物中心吕龙宝老师在收集样本上给予的帮助。本实验室戴正喜博士生和姚志红博士生在实验上也提供了大力支持, 一并表示衷心的感谢。

参考文献：

Bieniasz PD. 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack[J]. *Nat Immunol*, **5**(11): 1109-1115.

Brennan G, Kozyrev Y, Kodama T, Hu SL. 2007. Novel TRIM5 isoforms expressed by Macaca nemestrina[J]. *J Virol*, **81**(22): 12210-12217.

Brennan G, Kozyrev Y, Hu SL. 2008. TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(9): 3569-3574.

Diaz-Griffero F, Vandegraaff N, Li Y, McGee-Estrada K, Stremlau M, Welikala S, Si Z, Engelman A, Sodroski J. 2006. Requirements for capsid-binding and an effector function in TRIMCyp-mediated restriction of HIV-1 [J]. *Virology*, **351**(2): 404-419.

Franke EK, HE Y, Luban J. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions[J]. *Nature*, **372**(6504): 359-362.

Gao G, Guo X, Goff SP. 2002. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein [J]. *Science*, **297**(5587): 1703-1706.

Groves CP. 2001. Primate Taxonomy [M]. Washington, DC, USA: Smithsonian Institution Press.

Hatziioannou T, Ambrose Z, Chung NP, Piatak M Jr, Yuan F, Trubey CM, Coalter V, Kiser R, Schneider D, Smedley J, Pung R, Gathuka M, Estes JD, Veazey RS, KewalRamani VN, Lifson JD, Bieniasz PD. 2009. A macaque model of HIV-1 infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**(11): 4425-4429.

Kuang YQ, Tang X, Liu FL, Jiang XL, Zhang YP, Cao G, Zheng YT. 2009. Genotyping of TRIM5 locus in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to Human Immunodeficiency Virus type 1 infection [J]. *Retrovirology*, **6**: 58.

Li X, Song B, Xiang SH, Sodroski J. 2007. Functional interplay between the B-box 2 and the B30.2(SPRY) domains of TRIM5alpha [J]. *Virology*, **366**(2): 234-244.

Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B. 2007. A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection [J]. *AIDS*, **21 (Suppl 8)**: S19-26.

Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B [J]. *Cell*, **73**(6): 1067-1078.

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu [J]. *Nature*, **451**(7177): 425-430.

Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W. 2008. Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys [J]. *PLoS Pathog*, **4**(2): e1000003.

Nisole S, Lynch C, Stoye JP, Yap MW. 2004. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(36): 13324-13328.

Ribeiro IP, Menezes AN, Moreira MA, Bonvicino CR, Seuanez HN, Soares MA. 2005. Evolution of cyclophilin A and TRIMCyp retrotransposition in New World primates [J]. *J Virol*, **79**(23): 14998-15003.

Sawyer SL, Wu LI, Emerman M, Malik HS. 2005. Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(8): 2832-2837.

Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1 [J]. *Nature*, **430**(6999): 569-573.

Schaller T, Hue S, Towers GJ. 2007. An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins [J]. *J Virol*, **81**(21): 11713-11721.

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein [J]. *Nature*, **418**(6898): 646-650.

Si Z, Vandegraaff N, O'Huigin C, Song B, Yuan W, Xu C, Perron M, Li X, Marasco WA, Engelman A, Dean M, Sodroski J. 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(19): 7454-7459.

Song B, Gold B, O'Huigin C, Javanbakht H, Li X, Stremlau M, Winkler C, Dean M, Sodroski J. 2005. The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5α exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates [J]. *J Virol*, **79**(10): 6111-6121.

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys [J]. *Nature*, **427**(6977): 848-853.

Tang X, Kuang YQ, Zheng YT.2009. Research advance of TRIM5α on structure and restriction mechanism to HIV-1 replication [J]. *Chin J Virol*, **25**(2): 148-153. [汤霞, 况轶群, 郑永唐. 2009. TRIM5α 分子结构和限制 HIV-1 复制机制的研究进展. 病毒学报, **25**(2): 148-153.]

Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG. 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions [J]. *Nature*, **372**(6504): 363-365.

Towers GJ. 2007. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A [J]. *Retrovirology*, **4**: 40.

Virgen CA, Kratovac Z, Bieniasz PD, Hatziioannou T. 2008. Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(9): 3563-3568.

Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, Verschoor E, Heeney JL, Towers GJ. 2008. Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(9): 3557-3562.

Wolf D, Goff SP. 2007. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells [J]. *Cell*, **131**(1): 46-57.

Xu L, Yang L, Moitra PK, Hashimoto K, Rallabhandi P, Kaul S, Meroni G, Jensen JP, Weissman AM, D'Arpa P. 2003. BTBD1 and BTBD2 colocalize to cytoplasmic bodies with the RBCC/tripartite motif protein, TRIM5δ [J]. *Exp Cell Res*, **288**(1): 84-93.

Ylinen LM, Keckesova Z, Webb BL, Gifford RJ, Smith TP, Towers GJ. 2006. Isolation of an active Lv1 gene from cattle indicates that tripartite motif protein-mediated innate immunity to retroviral infection is widespread among mammals [J]. *J Virol*, **80**(15): 7332-7338.

Zhang F, Hatziioannou T, Perez-Caballero D, Derse D, Bieniasz PD. 2006. Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins [J]. *Virology*, **353**(2): 396-409.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 50−55 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01050

六个肥胖相关基因在食蟹猴 2 型糖尿病不同发病时期的差异表达



靳丽莎[1,3]，郝香芬[2]，彭白露[2]，张艳春[2]，万玉玲[2]，季 芳[2]，夏机良[2]，刘晓明[2,*]

(1. 中国科学院华南植物园，广东 广州 510650; 2. 广东省昆虫研究所，广东 广州 510260; 3. 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要： 2 型糖尿病(T2DM)是一种与基因密切相关的高发性代谢性疾病。采用高脂饮食 (其中含 15%猪油)喂养 25 只中老年雄性食蟹猴的方法，制备 T2DM 模型，通过检测血糖与血脂水平确定疾病发展进程，并利用实时 PCR 对外周血白细胞中的 6 个肥胖相关基因 mRNA 表达量进行测定。食蟹猴 T2DM 在临床前期和临床期口服糖耐量实验(OGTT)2-h 血糖值分别为(11.06±6.05) mmol/L 和(13.12±2.89) mmol/L，显著高于正常组；空腹血糖在临床期达到最大值，为(7.58±1.56) mmol/L(P<0.01)，说明其 T2DM 模型被成功诱导。但所检测的 6 个糖尿病肥胖相关基因中只有 C*DKN2B*、*IGF2BP2* 和 *FTO* mRNA 表达量与糖尿病发病进程呈正相关，且临床期 *IGF2BP2* 和 *FTO* 的表达量分别是对照组的 65.92 倍和 4.30 倍，差异极显著(P<0.01)。因此，基因 C*DKN2B*、*IGF2BP2* 和 *FTO* 可作为食蟹猴糖尿病早期诊断及预后评价的参考指标。

关键词： 食蟹猴; 2 型糖尿病; 肥胖相关基因; 基因表达
中图分类号： R587.1; Q959.848; R-332 **文献标志码：** A **文章编号：** 0254-5853-(2011)01-0000-06

Differential expression of six obesity-related genes with different disease phases of T2DM in cynomolgus monkey

JIN Li-Sha[1,3], HAO Xiang-Fen[2], PENG Bai-Lu[2], ZHANG Yan-Chun[2], WAN Yu-Ling[2], JI Fang[2], XIA Ji-Liang[2], LIU Xiao-Ming[2,*]

(1. *South China Botanical Garden*, *Guangzhou* 510650, *China*; 2. *Entomological Institute*, *Guangzhou* 510260, *China*; 3. *Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disease with a strong genetic component that is very prevalent in the world. The aim of this study is to investigate the association of a set of six obesity-related genes with the different disease phases of T2DM in a model using middle or aged cynomogus monkeys. A total of 25 male monkeys were used and fed with high-fat diet (15% lard). The disease development and progression of T2DM were monitored through the levels of plasma glucose and lipid. The mRNA expression of 6 genes was evaluated using real-time PCR on monocyte isolated from monkey peripheral blood. The 2-hour plasma glucose levels followed oral glucose tolerance test (OGTT) were (11.06±6.05) mmol/L and (13.12±2.89) mmol/L respectively (P<0.01), and the fasting plasma glucose level was (7.58±1.56) mmol/L (vs controls, P<0.01), indicating that we developed successful the models of pre-diabetic and diabetic disease in the cynomolgus monkey. Of the six tested genes, *CDKN2B*, *IGF2BP*2, and *FTO* genes were significantly up-regulated with disease progression in T2DM. We found that the expression of *IGF2BP*2 and *FTO* increased 65.92 and 4.30 folds in the developed T2DM. We conclude that the genes of *CDKN2B*, *IGF2BP*2, and *FTO* can be used as early diagnostic and prognostic biomarkers in type 2 diabetes.

Key words: Cynomolgus monkey; Type 2 diabetes; Obesity-related genes; Gene expression

2 型糖尿病是一种以高血糖为主要标志的具有多病因的复杂和异质的代谢性疾病，发病的主要原

收稿日期：2010-12-16；接受日期：2011-01-19
基金项目：广州市科技计划项目大型实验动物国际认证及外包服务(2009A1-E051)；广东省林业局项目实验猴繁育关键技术研究及产业示范(2009KJCX016)；“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划：人类重大疾病灵长类动物模型资源平台的建设(2011ZX09307-303-03)
[*]通讯作者(Corresponding author), E-mail: xemoonliu@hotmail.com
第一作者简介：靳丽莎(1986−)，女，研究方向：生物功能基因利用; E-mail: jinlisha123456@163.com

因是胰岛素抵抗或胰岛素分泌相对不足，同时肥胖也是主要危险因素。随着人们生活水平的提高，糖尿病的发病率呈逐年上升的趋势，患者年轻化。Yang et al (2010)对中国46 239个成年人糖尿病调查结果表明，中国糖尿病发病率高达 9.7%，糖尿病前期的患病率达 15.5%，据估算：中国现有糖尿病患者已达 9240 万例，居全球之首。国际糖尿病联盟统计，目前全球有糖尿病患者 2.33 亿，而且正以每年新发 700 万患者的速度猛涨。因此，鉴于糖尿病的高发病率、高度危害性和高并发症，利用高脂食物饲喂，制备类人 T2DM 食蟹猴模型显得尤为重要。此外，Yang et al (2010)的调查还显示有糖尿病但未诊断出来的患者约为 57%，糖尿病前期的患病率已经高过糖尿病患病率（高 5.8%），即现有的糖尿病诊断标准很难准确并全面筛查出糖尿病前期患者。因此，急需一种简便、可操作的标准应用于风险预警和早期诊断。一些糖尿病相关基因的表达在糖尿病症状明显出现前就可能已经发生改变，不同糖尿病相关基因的 mRNA 水平在发病不同时期很可能具有差异性表达，其表达水平的变化可以作为早期诊断的一个特征指标。

近年来，随着候选基因技术的不断完善，尤其是全基因组相关性分析(GWAS)及 SNP 技术的发展，已鉴定出多种糖尿病易感基因，如 *CDKN2B*, *CDKAL1*, *IGF2BP2* 和 *FTO* (Sladek et al, 2007; Zeggini et al, 2007; Scott et al, 2007; McCarthy & Zeggini, 2009; Steinthorsdottir et al, 2007)。其中，*CDKN2B* 位于 9 号染色体上，编码肿瘤抑制因子 p16INK4a，通过 cyclin D 抑制 CDK4 的活性，调节细胞周期，影响胰岛细胞的增殖与再生 (Duesing et al, 2008)。相反，*CDKAL1* 主要通过使一相胰岛素释放受损，从而增加糖尿病风险，但与胰岛素敏感性无关(Alena et al, 2008)。而肥胖基因 *FTO* 编码 2-酮戊二酸依赖性核酸去甲基化酶，其在下丘脑、脂肪组织中均有表达，且受进食状态的调节，但其参与的生物学途径尚不清楚(Frayling et al, 2007; Dina et al, 2007)，而且其与肥胖、BMI 相关联，主要表现为体重、腰围、脂肪重及空腹血清瘦素水平的增加，它的变异体可以增加脂肪的沉积，降低全身胰岛素敏感性，从而导致糖尿病(Camilla et al, 2008; Freathy et al, 2008)。*IGF2BP2*(胰岛素样生长因子 2mRNA 结合蛋白 2)调节 *IGF2* 的翻译，其在胎盘与胎儿发育中具有重要作用，在胎儿中与营养不良共同作用，影响糖代谢，与 T2DM 有关(Rong et al, 2009; Van et al, 2009)。*SOX4* 参与胰腺的发育和胰岛素分泌的调节，而 *IRX3* 则通过调节胰岛素分泌 β 细胞和胰高血糖素生成 ε 细胞的数目，直接影响肥胖与 T2DM (Ragvin et al, 2010)。因此，认为转录因子 *SOX4* 和 *IRX3* 与胰腺发育有关，可以调节胰岛素的分泌。为了了解这些肥胖相关基因的表达量与 T2DM 发病进程的相关性，本研究通过对糖尿病发病不同时期 6 个肥胖基因的 mRNA 表达量进行分析，从而为糖尿病风险预警和早期诊断提供指导。

1　材料及方法

1.1　实验材料

25 只食蟹猴由华南灵长类研究开发中心提供，年龄均大于 9 岁，采用单笼喂养，饲养温度 16～29℃，相对湿度 50%～80%。实验试剂：盐酸氯胺酮购自沈阳兽药厂，血糖试纸、血糖仪由强生公司提供，Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司，SYBR® Green 染料及 SYBR® Premix Ex TaqTM 购自 TaKaRa 公司，EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 由 TransGen Biotech 公司提供，引物由上海生工生物工程公司合成，红细胞裂解液自行配制(1.6 mmol/L EDTA, 10 mmol/L $KHCO_3$, 153 mmol/L NH_4C1, pH7.4) (Ma et al, 2007)。

1.2　实验方法

1.2.1　实验猴分组

参考 WHO 诊断标准，并根据所得基础血液生化指标、口服糖耐量(OGTT)实验以及尿检结果将糖尿病模型进程划分为 4 个时期 (表 1)，除对照组为普通膳食外，其余各组为高脂饮食(其中含 15%猪油)，喂养时间为 18 个月。

1.2.2　体况指标及血清生化指标测定

食蟹猴禁食 12～14 h 后，用盐酸氯胺酮按 10 mg/kg 体重剂量进行麻醉，用电子秤称量体重，米尺测量坐高、腹围和矢状腹围(平躺状态下，腹部最高处到背部水平面的垂直距离)。从后肢采取 3 mL 静脉血，置于干净管中，室温下，静置30 min, 3 220 ×g，水平离心 15 min，吸取上清，酶法测定 GLU、CHO (胆固醇)、TG(甘油三酯)、HDL-C(高密度脂蛋白)、LDL-C(低密度脂蛋白)。

1.2.3　OGTT 实验

实验猴禁食12～14 h 后，按4 g/kg 体重葡萄糖进行灌胃，用便携式血糖仪分别测定 0、30、60、

表 1 食蟹猴糖尿病模型不同时期定义标准

Tab. 1 The standard definition with the different disease phases of T2DM model in the cynomolgus monkey

时期 Phase	实验猴数目 (只) The number of Monkey	临床指标 Clinical indicators		
		空腹血糖 FPG (mmol/L) Fasting glucose	糖耐量情况 Glucose tolerance	尿糖 Urine glucose
对照 Control group	5	FPG<3.96	正常	阴性
模型初期 Initial phase	5	FPG<3.96	正常	阴性
模型中期 Metaphase	5	3.96< FPG< 5.7	空腹血糖受损(IFG)	阴性
临床前期 Preclinical phase	5	FPG< 5.7	糖耐量异常(IGT)	1+或 2+
临床期 Clinical phase	5	FPG≥5.7 且持续存在	糖耐量异常(IGT)	3+

90、120 min 血糖值, 并在 0、120 min 采取 0.5 mL 血液, 用猴胰岛素酶联免疫分析试剂盒测定胰岛素, 并根据实验结果计算血糖代谢指数, 其中 HOMA-IR = FPG × FINS/22.5; Si=1/(FPG×FINS); 空腹β细胞功能指数=FINS/FPG。

1.2.4 外周血白细胞总 RNA 提取及其 cDNA 制备

食蟹猴禁食 12～14 h 后, 从股静脉取血 5 mL, 将其与 25 mL 红细胞裂解液混匀, 冰上放置 30 min, 期间多次上下温和颠倒混匀, 随后离心收集白细胞。然后使用 Trizol (Invitrogen)提取外周血白细胞总 RNA (Puissant & Houdebine, 1990), 用 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech)将约 0.5 μg RNA 反转录为 cDNA, 所得 cDNA 于–20 ℃保存备用。

1.2.5 糖尿病 PCR 引物设计及荧光定量 PCR

设计了 6 个肥胖基因人猴通用的引物序列, 并以 GAPDH 和 YWHAZ 为内参(Sluimer et al, 2007), 所有肥胖相关基因和内参的 PCR 产物长度均在 180～250 bp 之间。用 SYBR Green 染料 (TaKaRa) 对 6 个基因进行荧光定量 PCR 分析, 反应体系为 20 μL: 10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (×2), 0.4 μL PCR 正向、反向引物(10 μmmol/L), 2 μL cDNA 模板(100 ng), 7.2 μLddH_2O。荧光定量 PCR 步骤: (1) 预变性 95℃, 30 s; (2) PCR 反应 95℃, 5 s; 60℃, 34 s, 共 40 个循环; (3) 融解曲线分析: 95℃, 15 min; 60℃, 1 h; 95℃, 15 min。

1.2.6 数据处理和分析

去除无信号、融解曲线差、CT<8 或 CT>35 及 ΔCT >13 的反应, 对荧光定量 PCR 结果进行初步分析, 并采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算各基因相对于对照食蟹猴中相应基因的表达量 (Livak & Schmittgen, 2001), 用 ANOVA 法比较正常、模型进程不同时期食蟹猴糖尿病肥胖相关基因的表达差异。而正常对照组基因的相对表达量是以自身组内的相应基因为参考, 内参基因的表达量是相对于另一个内参进行比对。

2 结 果

2.1 体况与代谢特征指标与糖尿病各时期的比较

食蟹猴 T2DM 发病不同时期体况与血清生化指标的比较如表 2 所示: 与对照组相比, 体重和腰围除模型中期外, 在其他时期都有不同程度地增加, 而矢状腹围与 BMI 在发病各时期变化不大; 血清脂质中 TG 和 HDL 变化不显著, CHO 与 LDL 在模型中期及临床期差异显著(P<0.05), 且 LDL 在模型中期、临床前期及临床期的含量分别增长了 14.62、11.83 和 11.69 倍; FPG 在临床期达到最大值, 为(7.58±1.56) mmol/L, OGTT 2 h 血糖在临床前期和临床期分别为(11.06±6.05) mmol/L 和(13.12±2.89) mmol/L, 显著高于初始值(P<0.01); 胰岛素含量在模型中期与临床前期含量升高, 临床期含量反而降低。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)与糖尿病发病进程呈正相关, 在临床期达到最大值; 而胰岛素敏感指数 Si 和空腹β细胞功能指数则相反, 在临床期最低, 分别为 0.0026 和 7.42(P<0.01)。

2.2 食蟹猴外周血白细胞中糖尿病肥胖相关基因 mRNA 表达差异

食蟹猴 T2DM 发病不同时期外周血白细胞中肥胖相关基因 mRNA 表达量如表 3 所示: *CDKN2B*、*IGF2BP2* 和 *FTO* 表达量随疾病的发生发展而上调, 在临床期达到最大值, 其中, *IGF2BP2* 和 *FTO* 的表达量分别是对照组的 65.92 和 4.30 倍, 差异极显著(P<0.01)。*IRX3* 和 *SOX4* 在对照样本中的相对表达量较低, 其 CT 值分别为(36.07±0.98)和(35.50 ± 0.18), 而 *GAPDH* CT 值为(22.48±4.67)。因此, 相对于表达量很高的阳性对照而言, 其基因表达量很低; 但在疾病发病进程中的各个时期得到有效表

表 2　食蟹猴 T2DM 发病不同时期体况与血清生化指标比较

Tab. 2　Anthropometrics and metabolic characteristics with the different disease phases of T2DM in the cynomolgus monkey

测定项目 Measurement items	时期 Phase				
	对照 Control group	模型初期 Initial phase	模型中期 Metaphase	临床前期 Preclinical phase	临床期 Clinical phase
体况指标 Anthropometric					
体重 Body weight (kg)	7.29±1.02	10.18±1.95**	06.55±1.93	07.65±2.08	09.12±2.70*
腰围 Waist circumference (cm)	37.80±3.83	48.30±5.95**	39.70±5.29	40.40±7.96*	42.70±9.44**
矢状腹围 Sagittal Abdominal circumference (cm)	9.90±1.14	11.80±1.30	10.40±1.14	09.90±1.78	11.90±2.48
体重质量指数 BMI (kg/m^2)	39.75±4.83	42.41±13.24	42.24±5.38	49.61±17.41	49.78±11.51
血清脂质水平 Fasting serum lipids (mmol/L)					
甘油三酯 TG	1.20±0.68	00.79±0.23	01.27±0.68	01.16±0.69	00.79±0.40
胆固醇 CHO	2.07±0.35	04.14±0.59	10.57±5.21*	08.36±5.41	10.79±5.62*
高密度脂蛋白 HDL	1.13±0.17	01.55±0.73	01.80±0.40	01.94±0.90	01.88±0.62
低密度脂蛋白 LDL	0.78±0.27	01.38±1.36	12.19±7.08*	10.01±8.65*	09.90±7.42*
血糖 Plasma glucose (mmol/L)					
空腹血糖 Fasting glucose	3.46±0.32	03.66±0.21	04.78±0.58*	04.12±0.67	07.58±1.56**
糖耐量 2 h 血糖 2 h plasma glucose followed OGTT	3.36±0.36	03.71±0.23	03.68±0.55	11.06±6.05**	13.12±2.89**
胰岛素 Serum insulin (pmol/L)					
空腹胰岛素 Fasting insulin	59.27±4.27	62.12±5.18	78.28±5.16**	70.72±7.26**	54.86±9.78
血糖代谢指数 Derived indices					
胰岛素抵抗指数 HOMA-IR	9.10±0.93	10.13±1.28	16.58±1.69**	14.19±1.55**	18.74±6.92**
胰岛素敏感指数 (Si, $\times10^{-2}$)	0.49±0.06	00.41±0.09*	00.27±0.03**	00.32±0.04**	00.26±0.07**
空腹 β 细胞功能指数 FBCI	17.26±2.27	16.98±1.24	16.61±2.61	15.71±2.13	07.42±1.67**

数据以平均值±标准误表示; *, **分别表示差异显著和极显著。

Values are means±*SE*; the * and ** over bars indicate significantly different with $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

表 3　食蟹猴 T2DM 不同发病时期 6 个肥胖基因的相对表达量

Tab. 3　The relative expression of six obesity-related genes with the different disease phases of T2DM in the cynomolgus monkey

基因符号 Symbol	基因名称 Gene name	时期(Phase)				
		对照 Control group	模型初期 Initial phase	模型中期 Metaphase	临床前期 Preclinical phase	临床期 Clinical phase
肥胖基因 Obesity associated gene						
CDKAL1	Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	1.40±0.48	N/A	N/A	0.21	N/A
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B	1.03±0.29	03.04±0.83	04.33±0.34	05.08±1.66*	05.78±3.52*
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mrnabinding protein 2	1.25±0.59	13.58±0.04*	32.87±8.89**	61.02±9.25**	65.92±4.39**
FTO	Fat mass and obesity associated gene	0.26±0.04	0.62±0.05	02.08±0.86*	04.15±1.54**	04.30±0.78**
IRX3	Iroquois homeobox	N/A	1.40	0.71	1.00	00.64±0.24
SOX4	SRY-related high mobility group-box 4	N/A	2.21	1.75	1.00	00.86±0.03
内参基因 Positive control						
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1.13±0.47	00.99±0.16	00.94±0.11	00.98±0.13	00.96±0.12
YWHAZ	Phospholipase A2	1.34±0.89	00.99±0.74	01.36±0.48	01.33±0.84	01.39±0.78

mRNA 表达量以平均值±标准误表示; *,** 分别表示差异显著和极显著; N/A 即无效的，表示相对于对照来说表达量较低。

Values are means±*SE*; the * and ** over bars indicate significantly different with $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively. N/A, that is not available, indicates low expression compared with the control group.

达，以临床前期样本基因表达量作为基准进行分析，两个基因表达量变化均不明显。*CDKAL1* 只在对照组和临床前期有效表达，而在模型的其他时期相对表达量较低。内参基因 *GAPDH* 和 *YWHAZ* 的相对表达量应该是 1，但由于存在个体差异，因此表达量有一定的偏差。

3 讨 论

根据群体圈养雄性食蟹猴基础血糖值为(3.32±0.59) mmol/L(Hao et al, 2010)；猕猴正常 FPG<4.4 mmol/L，糖尿病 FPG≥5.6 mmol/L(LeRoith et al, 2004)；并参考目前 WHO 对人的糖尿病最新诊断标准，结合本实验结果(对照组及模型初期食蟹猴平均血糖值为 2.96 mmol/L，且最大值为 3.96 mmol/L，而对出现胰岛素抵抗，持续高血糖，尿糖 3+的食蟹猴血糖值统计结果表明：FPG≥5.7 mmol/L)界定了中老年雄性食蟹猴 T2DM 模型各时期 FPG 标准，即 FPG<3.96 mmol/L 定义为对照及糖尿病模型初期；FPG≥5.7 mmol/L 为临床期；FPG 介于对照与临床期之间，且糖耐量正常的为模型中期；由于糖耐量异常时血糖值低于或高于正常。因此，将 FPG<5.7 mmol/L，其糖耐量异常的定义为临床前期。

食蟹猴腰围和体重在 T2DM 模型初期比其他时期偏高，这可能是由于食蟹猴从群养到单笼喂养缺少运动造成的。此外，FPG、CHO、LDL 和 HOMA-IR 升高，Si 和空腹 β 细胞功能指数降低，表明在糖尿病发病进程中发生了胰岛素抵抗和糖耐量异常，进而导致糖尿病。有研究认为，T2DM 患者与正常人相比，体内 β 细胞数量减少(Butler et al, 2003; Yoon et al, 2003)，胰岛素分泌量减少，临床期胰岛素含量低于正常也正说明了这一点。据此，认为食蟹猴 T2DM 模型被成功诱导。

Krishnamurthy et al (2006)研究发现，$p16^{INK4a}$ 表达量随年龄的增长而增加，其限制了 β 细胞的再生，从而可以诱发胰岛素抵抗。Church et al (2010)报道，*FTO* 过量表达导致小鼠肥胖的主要原因是增加了其对食物的摄取量。本研究结果显示，与对照样本相比，*CDKN2B* 和 *FTO* 在发病进程中 mRNA 表达量上调，特别是临床前期和临床期存在显著差异，这两个基因可能通过影响 β 细胞的功能及胰岛素敏感性来增加患病风险。*IGF2BP2* 的表达量在建模初期就出现明显增高，并随病程的发展进一步提高；而 *IRX3*、*SOX4* 和 *CDKAL1* 在糖尿病发病的某些时期相对表达量较低，其与食蟹猴糖尿病的相关性还有待进一步证实。综合以上结果，三个肥胖相关基因 C*DKN2B*、*IGF2BP*2 和 *FTO* 与糖尿病具有明显的相关性，因此可作为食蟹猴糖尿病早期诊断及预后评价的参考指标。

参考文献：

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC, 2003. β-cell deficit and increased β-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. Diabetes, **52**: 102-110.

Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L, Wells S, Brüning JC, Nolan PM, Ashcroft FM, Cox RD, 2010. Over expression of *FTO* leads to increased food intake and results in obesity [J]. *Nat Genet*, **42**: 1086-1092.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoeur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P, 2007. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity [J]. *Nat Genet*, **39**: 724-726.

Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Balkau B, Froguel P, Gibson F, 2008. Strong association of common variants in the *CDKN2A/CDKN2B* region with type 2 diabetes in French Europids [J]. *Diabetologia*, **51**: 821-826.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI, 2007. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity [J]. *Science*, **316**: 889-894.

Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruokonen A, Ebrahim S, Shields B, Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Lango H, Melzer D, Ferrucci L, Paolisso G, Neville MJ, Karpe F, Palmer CN, Morris AD, Elliott P, Jarvelin MR, Smith GD, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM, 2008. Common variation in the *FTO* gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI [J]. *Diabetes*, **57**: 1419-1426.

Hao XF, Wan YL, Li XJ, Ji F, Peng BL, Rao JH, Liu XM, 2010. The investigation of the basal glucose in cynomolgus[J]. *Sichuan J Zool*, **30**(1): 111-114.[郝香芬，万玉玲，李学家，季芳，彭白露，饶军华，刘晓明，2011. 食蟹猴的基础血糖值调查. 四川动物，**30**(1): 111-114.]

Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE, 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential [J]. *Nature*, **443**: 453-457.

LeRoith D, Olefsky JM, Taylor SI, 2004. Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text [M]. 3rd ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 22DDCT method [J]. *Methods*, 2**5**: 402-408.

Ma J, Dempsey AA, Stamatiou D, Marshall KW, Liew CC, 2007. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects [J]. *Atherosclerosis*, **191**(1): 63-72.

McCarthy MI, Zeggini E, 2009. Genome-wide association studies in type 2 diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, **9**(2): 164-171.

Puissant C, Houdebine LM, 1990. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Biotechniques*, **8**(2): 148-149

Ragvin A, Moro E, Fredman D, Navratilova P, Drivenes Ø, Engström PG, Alonso ME, de la Calle Mustienes E, Gómez Skarmeta JL, Tavares MJ, Casares F, Manzanares M, van Heyningen V, Molven A, Njølstad PR, Argenton F, Lenhard B, Becker TS, 2010. Long-range gene regulation links genomic type 2 diabetes and obesity risk regions to *HHEX*, *SOX4*, and *IRX3* [J]. *PNAS*, **107**(2): 775-780.

Rong R, Hanson RL, Ortiz D, Wiedrich C, Kobes S, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ, 2009. Association analysis of variation in/near FTO, *CDKAL*1,*SLC30A8, HHEX*, *EXT2*, *IGF2BP2*, loc387761, and *CDKN2B* with type 2 diabetes and related quantitative traits in pima indians [J]. *Diabetes*, **58**: 478-488.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding1 CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW , Goldstein JL, Watkins J, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M, 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants [J]. *Science*, **316**(5829): 1341-1345.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes [J]. *Nature*, **445**(7130): 881-885.

Sluimer JC, Kisters N, Cleutjens KB, Volger OL, Horrevoets AJ, van den Akker LH, Bijnens AP, Daemen MJ, 2007. Dead or alive: gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery [J]. *Physiol Genomics*, **30**(3): 335-341.

Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, Ghosh S, 2007. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes [J]. *Nat Genet*, **39**(6): 770-775.

Van Hoek M, Langendonk JG, de Rooij SR, Sijbrands EJ, Roseboom TJ, 2009. Genetic variant in the *IGF2BP*2 gene may interact withfetal malnutrition to affect glucose metabolism [J]. *Diabetes*, **58**: 1440-1444.

Yang WY, Lu JM, Weng JP, Jia WP, Ji LN, Xiao JZ, Shan ZY, Liu J, Tian HM, Ji QH, Zhu DL, Ge JP, Lin LX, Chen H, Guo XG, Zhao ZG, Li QA, Zhou ZG, Shan GL, He J, 2010. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, **362**(25): 2425-2426.

Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S, 2003. Selective β-cell loss and α-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea [J]. *Clin Endocrinol Metab*, **88**: 2300-2308.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes [J]. *Science*, **316**(5829): 1336-1341.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 56−61 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01056

应用改良流式法检测猕猴和食蟹猴体内血型抗体水平的分布情况



张 弛[1], 王筱啸[1], 王 璐[1], 向 莹[1], 魏 晴[2], 王婉瑜[3], 熊郁良[3], 陈 实[1], 陈 刚[1,*]

(1. 华中科技大学 同济医学院附属同济医院器官移植研究所, 器官移植教育部重点实验室, 卫生部器官移植重点实验室, 湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学 同济医学院附属同济医院血库, 湖北 武汉 430030; 3. 中国科学院昆明动物研究所 动物毒素室, 云南 昆明 650223)

摘要: 绝大部分灵长类动物存在与人类相似的 ABO 血型系统, 该研究采用改良流式法(flow cytometry method, FCM)检测猕猴及食蟹猴血清中血型抗体水平的分布情况。以流式细胞术为基础, 使用商品化人源红细胞为靶细胞, 并通过加入特异性荧光标记的抗人 IgM 或 IgG 二抗, 对收集的实验用猕猴及食蟹猴的血清样本进行检测, 以人类健康受试者的血清样本为对照, 比较两者血型抗体水平的差异。结果显示：预先用人 O 型浓缩红细胞吸附猴血清中所含种属间非特异性抗体后, FCM 法能够准确检测其血型抗体水平及分型, 并且发现猴血清中天然血型抗体的水平明显低于健康人($P<0.05$)。由此得出：通过预处理清除非特异性抗体的干扰后, FCM 法同样适用于灵长类动物血清中血型抗体的检测, 也为构建灵长类动物模拟人 ABO 血型不合器官移植模型提供了技术保障和实验数据。

关键词： 流式检测法; ABO 血型抗体; 猕猴；食蟹猴
中图分类号： R-332; Q959.848 **文献标志码：** A **文章编号：** 0254-5853-(2011)01-0056-06

Application of flow cytometry to detect ABO blood group antibody levels in rhesus monkeys and cynomolgus monkeys

ZHANG Chi[1], WANG Xiao-Xiao[1], WANG Lu[1], XIANG Ying[1], WEI Qing[2], WANG Wan-Yu[3], XIONG Yu-Liang[3], CHEN Shi[1], CHEN Gang[1,*]

(1. *Institute of Organ Transplantation*, *Tongji Hospital*, *Tongji Medical College*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Key Laboratory of Organ Transplantation*, *Ministry of Education, Key Laboratory of Organ Transplantation*, *Ministry of Health*, *Wuhan* 430030, *China*; 2. *Blood Bank of Tongij Hospital*, *Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan* 430030, *China*; 3. *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract: Similar to humans, most of non-human primates also contain the ABO blood group system. In this study, we sought to evaluate the ABO antibody (Ab) levels in monkeys using a modified flow cytometry method (FCM). The standard commercial human A or B-red blood cells (RBCs) were used as target cells. The binding of target cells and anti-A or B blood group Ab in sera of rhesus or cynomolgus monkeys was detected by flow cytometry after adding secondary specific fluorescence-labeled anti-human IgG or IgM Ab. Human healthy blood donor sera were used as controls. The results revealed that, using clear monkey sera, which were pre-absorbed on normal human type O RBCs to remove non-specific anti-human Abs, the modified FCM gave an accurate detection of ABO Ab levels in monkeys. When compared with the results of human sera, the distribution of ABO Ab levels in monkey sera were significantly lower ($P<0.05$). We concluded that the modified FCM could be used for the detection of monkey ABO Ab levels. The technique and data will be very valuable for the future establishment of ABO-incompatible organ transplant models in non-human primates, which could improve clinical applications.

Key words: Flow cytometry; ABO blood group antibody; Rhesus monkeys；Cynomolgus monkey

收稿日期：2010-12-08; 接受日期：2010-12-30
基金项目：国家自然科学基金面上项目(30872384)
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: gchen@tjh.tjmu.edu.cn

绝大部分灵长类动物, 如狒狒, 猕猴, 食蟹猴等, 也存在与人类相似的ABO血型系统, 虽然其外周血红细胞上极少表达A或B血型抗原, 但其循环系统中同样可预存一定水平的血型特异性抗体(Terao et al, 1981; Doxiadis et al, 1998)。猕猴及食蟹猴是临床前实验模型中最常用的灵长类动物, 其血清内血型天然抗体水平及分布情况尚无明确的报道。灵长类动物的器官移植模型是常用的重要的临床前研究模型, 受者循环中的血型天然抗体可能导致血型不合供者器官的体液性损伤, 从而显著影响移植物存活(Cooper et al, 1988, 1989)。因此, 研究灵长类动物循环中血型天然抗体水平的分布情况具有较为重要的亚临床应用价值。Stussi et al (2005)建立了一种通过流式细胞仪(FCM)来检测人天然血型抗体水平的新方法, 我们在其基础上加以改良, 并首次应用于灵长类动物, 通过对比人类健康受试者, 研究了猴血型天然抗体水平的具体分布情况及其与人类对比的差异。

1　材料与方法

1.1　红细胞与血清样本

实验靶红细胞为商品化的人源 ABO 血型悬浮红细胞, 细胞比例相对恒定且表位具有较稳定均一的血型抗原表达量, 来源于上海血液生物医药有限责任公司。所有猴或健康受试者的血清样本均与对应分型的靶红细胞结合, 以检测血清中预存的天然血型抗体水平。健康猕猴 25 只 (A 型 6 只, B 型 14 只, AB 型 5 只)和食蟹猴 24 只 (A 型 8 只, B 型 12 只, AB 型 4 只)分别来源于中国科学院昆明动物研究所实验动物中心和广州蓝岛生物技术有限公司华南灵长类研究开发中心, 猕猴体重约 5～10 kg, 食蟹猴体重约 3～5 kg, 均为雄性。52 份健康受试者血清样本 (A 型 16 例, B 型 16 例, O 型 12 例, AB 型 8 例), 均来源于本移植中心亲属移植健康供者捐献, 男女比例为 50%, 平均年龄为 42 岁(28～55 岁)。所有血清均通过标准方法鉴定血型并确定为 HIV、HBV、HCV 阴性, Rh 均为阳性。

新鲜血清样本的采集：使用促凝管采血 5mL, 室温静置 2 h, 放置 4℃冰箱过夜, 可见清亮血清析出, 离心 10 min (3 800 r/m), 吸取血清分装后放置 −80℃冰箱保存备用。

1.2　流式法(FCM 法)检测人血清的血型抗体水平

调整红细胞浓度约为 1×10^8/mL, 每管吸取 50 μL 与等体积倍比稀释的待测血清混合, 轻微振荡后 4℃孵育 30 min, 流式缓冲液(PBS+2%BSA+0.1%叠氮钠)清洗 2 次, 1 000 r/m 离心 5 min, 分别滴加 1∶50 稀释的、FITC 标记的羊抗人 IgM 或 IgG 二抗 10 μL/管(北京中衫金桥生物技术有限公司), 4℃避光孵育 30 min, 再清洗 2 次后添加流式缓冲液 300 μL/管, 然后采用流式细胞仪检测(FACSAria Becton Dickinson)。为去除非特异性交叉抗体的干扰, AB 型混合血清预先与浓缩 A 和 B 红细胞孵育后作为阴性对照; O 型混合血清作为阳性对照。检测结果以扣除阴性对照后的几何平均荧光度(Gmean)值来衡量抗体结合水平。为使结果准确可靠, 所有检测均重复 2 次取平均值。

1.3　FCM 法检测猴血清的血型抗体

为去除猴血清中可能存在的种属间非特异性抗体的干扰, 取 200 μL 新鲜猴血清标本与 100 μL 浓缩人 O 型红细胞混匀后, 37℃水浴 30 min, 900*g* 离心 5 min, 吸取上清, 再次 1 200*g* 离心 5 min, 获取上清, 重复吸附 1 次后获得最终吸附后的猴血清, 分装冻存备用。余检测猴血型抗体步骤同 1.2 节。分别检测吸附前、后猴血清的血型抗体水平, 以了解种属非特异性抗体的干扰情况。

1.4　数据统计

所有数据分析使用 SPSS17.0。两组血清样本滴度比较采用非参数检验, SD(标准差)作为衡量变异度。采用双向检验, $P<0.05$ 为统计学差异。

2　结　果

2.1　猴的各分型血清在吸附前、后的抗 A 或抗 B 抗体的 IgM 和 IgG 定性检测情况

通过 FCM 法检测猴血清标本中最适宜滴度下的抗 A 及或抗 B 抗体的阳性情况, 并检测抗体水平在血清吸附前后的差异。结果显示, 吸附前存在一定的种属间非特异性抗体的干扰, 出现低水平的假阳性, 吸附后干扰消失。吸附后在 B 型血清中检测到明显的抗 A 型红细胞的 IgM 抗体, 而在 A 和 AB 型血清中则未检测到上述抗体; 在 A 型血清中检测到明显的抗 B 型红细胞的 IgM 抗体, 而在 B 和 AB 型血清中则未检测到。抗 A 或 B 型红细胞的 IgG 抗体在吸附后的 A、B 及 AB 型血清中均未检测到(图 1)。

2.2　猴血清中种属间非特异性抗体对血型抗体的半定量检测的干扰

采用人 O 型浓缩红细胞预先吸附处理猴血清中种属间非特异性抗体, 通过 FCM 法检测吸附前后血清中的血型抗体随血清倍比稀释的荧光强度的变化。图 2 显示一例食蟹猴典型个例的检测结果, 吸附后的猴 07cy05(血型为 B)的抗人 A 型红细胞的 IgM 抗体较吸附前血清有所降低, 但仍保持一定的

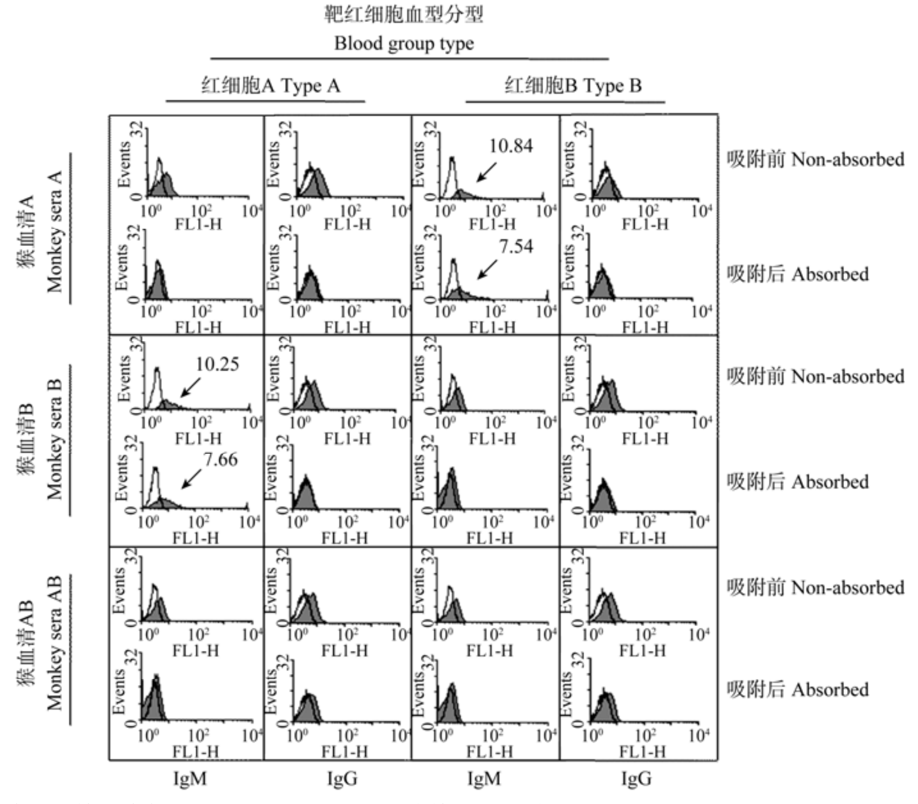


图 1 FCM 法分别检测食蟹猴的 A、B 及 AB 型血清特异吸附前、后的抗人红细胞抗原 A/B 的 IgM 和 IgG 水平

Fig. 1 Measurement of anti-A/B IgM and IgG by FCM in A、B or AB blood group sera in cynomolgus monkeys before and after specific adsorption

透明图：吸附后的猴 AB 型血清与人红细胞表面抗原 A/B 结合(阴性对照); 灰色：填充图为各型猴血清与人红细胞表面抗原 A/B 的结合。

Open histograms represent the staining of the binding of absorbed monkey AB serum with human A or B- RBCs (negative control). The grey filled histograms represent the staining of the binding of the tested monkey sera with human A or B- RBCs.

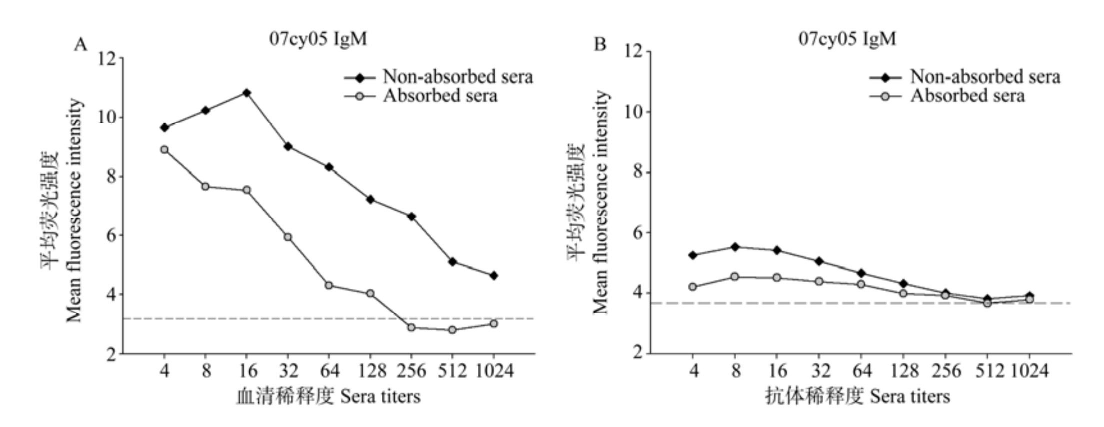


图 2 流式分析显示一例 B 型食蟹猴 (07cy05)血清特异吸附前后的抗 A 抗体 IgM 和 IgG 的变化水平

Fig. 2 Changes of anti-A IgM and IgG levels measured by FCM in a blood group B cynomolgus monkey’s serum (07cy05) before and after specific adsorption

A) 吸附后的抗 A 抗体 IgM 强度略有下降但仍显示一定的阳性水平; B) 抗 A-IgG 抗体在血清吸附处理后基本接近于阴性对照。

A) anti-A IgM levels decreased after specific adsorption of the serum but still kept positive; B)anti-A IgG levels were very closed to negative control after the absorption of the serum.

阳性水平(图 2A); 吸附前血清的血型抗体 IgG 检测出现低水平的阳性情况, 而吸附后基本降至阴性水平(图 2B)。而其他猴血清中针对人 A 或 B 型红细胞的抗A或B抗体水平检测结果与所示典型个例的趋势相似。

2.3　流式法对于猴血清中 ABO 血型抗体滴度的判定

在 FCM 法检测所有猴的血清样本(吸附后)的结果判定中, 我们均以检测到的几何平均荧光强度(Gmean)值最早接近或基本达到阴性对照值时的血清倍比稀释度为衡量点, 用以判定所检测血清的血型抗体滴度水平(图 3)。此外, 为了使判定结果更为准确可靠, 在不加血清的单纯阴性对照基础上, 加设同例血清针对同型人红细胞反应的自身阴性对照组。如图 3 所示, 一例 B 型的食蟹猴血清稀释度在 1∶256 时针对人 A 型红细胞的血型抗体的荧光强度水平非常接近两组阴性对照, 故判定该例血清中的血型抗体滴度水平为 1∶256(图 3)。

2.4　比较人和猴血清中天然血型抗体滴度水平的分布差异

采用 FCM 法检测收集的全部 52 例健康受试者

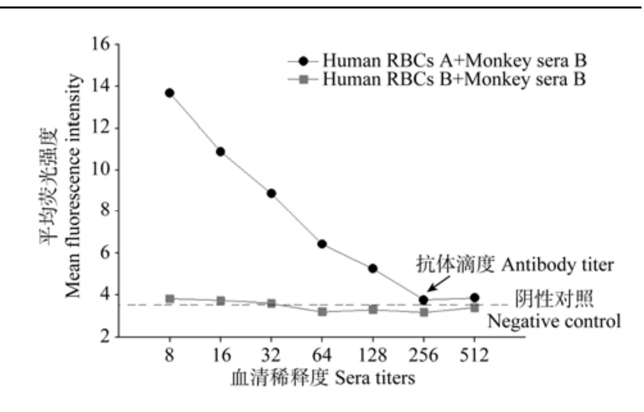


图 3　FCM 法检测一例 B 型食蟹猴血清单样本中随稀释度变化的抗 A-IgM 抗体水平及抗体滴度的判定

Fig. 3　Anti-A IgM levels in doubling diluted sera of a blood group B cynomolgus monkey measured by FCM and the determination of the antibody titer

黑色圆点折线：平均荧光值降低点最接近阴性对照即 1∶256 时为抗体滴度; 虚线：单纯阴性对照; 灰色方块折线：同例血清针对抗原 B 的自身阴性对照。

The black dot curve showed that the serum dilution (1∶256) was used to represent the anti-A IgM level, at which the mean fluorescence intensity was the first one very closed to the negative control. The dash line represented the negative control without adding the monkey serum. The gray block curve represented the self negative control using the same monkey serum reacted with blood group B human RBCs.

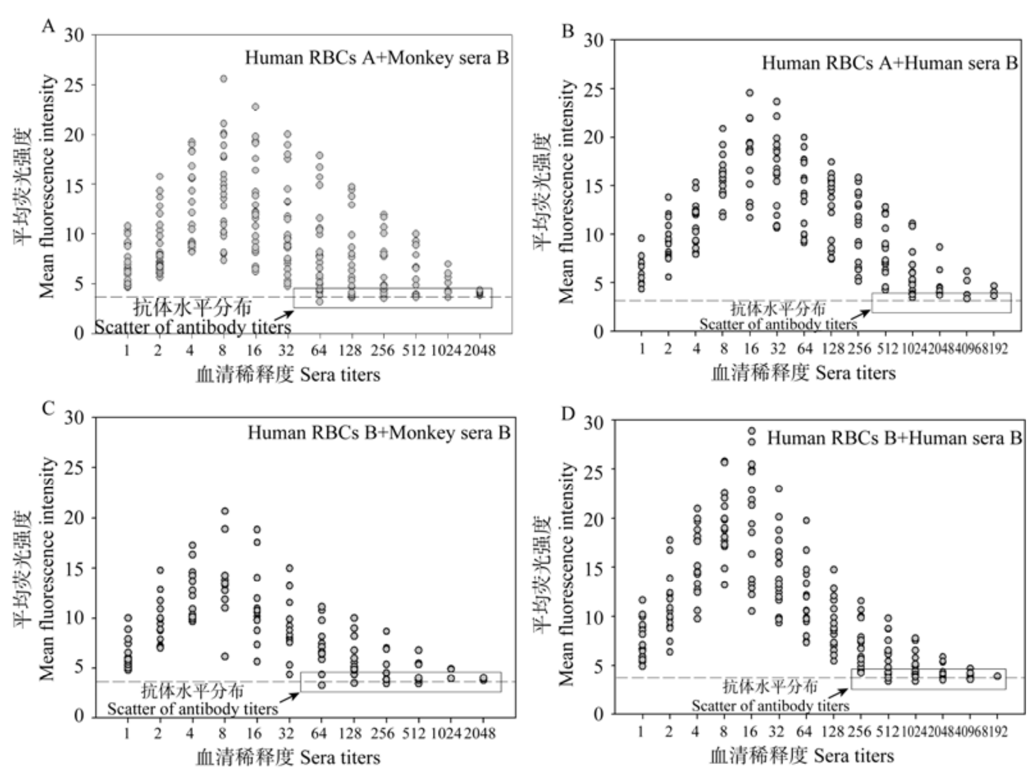


图 4　通过 FCM 法检测的所有收集的猴(猕猴和食蟹猴)和人(健康受试者)血清样本中血型抗体 IgM 水平的分布

Fig. 4　The distributions of anti-A/B IgM antibodies levels in the sera of all the monkey (Rhesus and Cynomolgus monkeys) and human blood samples

A、C：猴血清中抗 A/B 的血型抗体水平主要分布在 1∶64～1∶2 048 之间; B、D：人血清中抗 A/B 的血型抗体水平主要分布在 1∶512～1∶8 192 之间。 A,C: the levels of anti-A/B IgM antibody in monkey sera were ranging from 1∶64 to 1∶2048; B,D: the levels of anti-A/B IgM antibody in human sera were ranging from 1:512 to 1∶8192.

及 25 例猕猴和 24 例食蟹猴的血清样本, 在所收集的健康受试者和实验猴的 A 或 B 型血清中针对同批商品化人源 B 或 A 型红细胞的血型抗体滴度分布结果显示, 猴血清中血型抗体滴度主要分布在 1∶64 到 1∶2 048 之间(图 4A、C); 而人血清中血型抗体滴度主要分布在 1∶512 到 1∶8 192 之间(图 4B、D)。结果统计比较, 猴血清中天然血型抗体的滴度水平明显低于健康人($P<0.05$)。表 1 显示了所收集的健康受试者和实验猴的 A 或 B 型血清样本中针对相对应的 B 或 A 型红细胞抗原的血型抗体滴度水平分布及所占各样本总数的比例情况。

表 1 所有猴和人血清样本中抗 A/B 抗体 IgM 滴度的测定结果

Tab.1 Frequency of anti-A/B IgM antibody titers in monkey and human sera

血清稀释度 Sera titers	血清组别 Blood group of sera	
	A	B
猕猴样本数 No. Rhesus	6	14
血清稀释度 Sera titers	anti-B antibody	anti-A antibody
1∶64	1(16.7%)	1(7.1%)
1∶128	0(0%)	3(21.4%)
1∶256	2(33.3%)	3(21.4%)
1∶512	1(16.7%)	4(28.6%)
1∶1 024	1(16.7%)	1(7.1%)
1∶2 048	1(16.7%)	2(14.3%)
食蟹猴样本数 No. cynomolgus	8	12
血清稀释度 Sera titers	anti-B antibody	anti-A antibody
1∶64	0(0%)	1(7.1%)
1∶128	1(12.5%)	3(21.4%)
1∶256	3(37.5%)	2(14.3%)
1∶512	2(25%)	2(14.3%)
1∶1024	1(12.5%)	1(7.1%)
1∶2048	1(12.5%)	3(21.4%)
健康受试者样本数 No. human donors	16	16
血清稀释度 Sera titers	anti-B antibody	anti-A antibody
1∶512	2(12.5%)	0(0%)
1∶1 024	5(31.3%)	6(37.5%)
1∶2 048	4(25%)	5(31.3%)
1∶4 096	4(25%)	2(12.5%)
1∶8 192	1(6.3%)	3(18.8%)

*n (n%)分别代表对应抗 A/B 抗体滴度的例数及所占各分类样本数的比例。

*n (n%) represents the numbers of the anti-A/B antibody titers and the percentages of the titer in the same blood group sera.

3 讨 论

对于血型抗体水平的检测, 传统的方法是直接血凝法。该法基于红细胞和相应血清的交叉反应, 在以往的临床溶血反应和 ABO 血型不合器官移植中得到广泛应用。然而, 血凝法检测的是血型抗体对靶红细胞的总体效应, 不能检测出血型抗体的亚型水平, 如 IgM 及 IgG 分别的水平, 而且这种方法不够精确, 可重复性不够令人满意(Rieben et al, 1991, 1992)。基于此, 人们尝试改进多种方法, Stussi et al (2005)建立了一种通过流式细胞仪(FCM)来检测人天然血型抗体水平的新方法, 能较准确评价血型抗体 IgG 及 IgM 分别的水平, 但其采用的靶红细胞需要较为复杂的特殊处理。我们在以往的研究中对 Stussi et al (2005)的 FCM 法加以改进, 用于检测人血清中血型抗体的水平, 取得了较为满意的检测结果。我们直接使用商品化的人源 ABO 血型悬浮红细胞, 避免了采用全血来源的红细胞的凝集造成的检测误差, 简化了 FCM 法。并通过与传统的血凝法对比, 发现 FCM 法具备较多优势, 如能检测到红细胞抗原表位上结合的绝大部分血型抗体, 测定的血型抗体水平更灵敏, 重复性好, 结果更可靠, 并且通过间接标记特异的荧光二抗即能快速准确地检测出不同抗体的分型水平。

在本研究中, 我们进一步将 FCM 法应用于猴, 以期客观准确地评价灵长类动物血清中血型抗体水平及其与正常人的差异。由于猴的红细胞表位极少表达血型抗原, 我们也统一使用商品化的人源 ABO 血型悬浮红细胞作为靶细胞, 使细胞比例相对恒定且表位具有稳定均一的抗原表达量。对比应用于检测人血清的技术改良之处主要为, 预先吸附猴血清中所含的种属间非特异性抗体以尽量避免背景假阳性对检测结果的干扰。结果显示, 预处理吸附后, 猴血清中针对靶细胞抗原的预存抗体的 IgG 基本降至阴性水平, 而 IgM 虽有下降但仍存在一定水平的阳性强度, 故我们认为猴血清中血型抗体的类型主要为 IgM。这个发现也与 Terao et al (1988)的研究结果相一致。

在人 ABO 血型不合器官移植临床应用上, 受者血清中血型抗体滴度的判定直接影响到不同移植中心 ABO 血型不合移植术的准入标准及免疫吸附方案的具体实施猴 (Tanabe, 2007)。针对猴, 我们通过对大量血清标本的不同稀释度检测结果的统计分析得出判定标准, 以检测到的 Gmean 值最早接近或达到阴性对照值时的血清稀释度为判定点, 实际操作中较为客观准确, 且易于判断。

Cooper et al (1989)早期研究表明，在狒狒的ABO血型不合同种异体心脏移植术后由血型抗体介导的急性体液性排斥例数，占33%；而67%为细胞性排斥，较临床人类ABO血型不合移植(未经特殊处理)的急性体液性排斥发生率低，推测狒狒血清中预存的血型抗体早期由于血管屏障未能有效的识别组织中的血型抗原或抗体水平不足以介导急性体液性排斥。我们通过对收集的健康受试者和实验猴的血清样本的血型抗体滴度水平检测的结果显示，猴血清中针对红细胞抗原A或B的血型抗体滴度主要分布在1∶64到1∶2 048之间，而人血清中血型抗体滴度主要分布在1∶512到1∶8 192之间，对比得出猴血清中天然血型抗体的滴度水平明显低于健康人。这个实验结果也间接支持了Cooper et al (1993)和Galili (2006)所报道的由于灵长类动物血清中预存血型抗体水平不足以介导急性体液性排斥的事实。

在ABO血型不合器官移植导致的排斥反应中，受者循环系统中的血型抗体水平发挥关键作用，因此稳定可靠的血型抗体检测技术对于手术全程的抗体监测至关重要。我们建立的改良FCM法用于猴血清中血型抗体的检测，结果显示该法较为准确适用，对构建模拟人ABO血型不合器官移植术的灵长类动物模型提供了技术保障。预先抽血检测实验猴血清中预存的血型抗体水平即可初步筛选出适用于ABO血型不合配对可能发生急性体液性排斥的阳性对照组，也可通过皮下注射血型抗原预先免疫，以特异升高血型抗体水平，从而成功建立灵长类ABO血型不合器官移植急性体液性排斥模型(Cooper et al, 1988，1993)，这为进一步模拟临床ABO血型不合移植的深入研究提供了良好的灵长类大动物模型。

总之，我们建立了一种准确度和敏感度都更好的FCM法来检测猴血清中抗A或B血型抗体的水平及分型。并通过该技术检测出健康受试者和实验猴血清中血型抗体滴度的具体分布情况。FCM法可能成为一种标准化和统一化的新技术，并可能逐步替代目前国内外ABO血型不合移植所采用的血型抗体监测手段。

参考文献：

Cooper DK, Human PA, Rose AG, Rees J, Keraan M, Reichart B, Du Toit E, Oriol R. 1989.The role of ABO blood group compatibility in heart transplantation between closely related animal species: An experimental study using the vervet monkey to baboon cardiac xenograft model [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **97**(3): 447-455.

Cooper DK, Lexer G, Rose AG, Keraan M, Rees J, Du Toit E, Oriol R. 1988.Cardiac allotransplantation across major blood group barriers in the baboon [J]. *J Med Primatol*, **17**(6): 333-346.

Cooper DK, Ye Y, Niekrasz M, Kehoe M, Martin M, Neethling FA, Kosanke S, DeBault LE, Worsley G, Zuhdi N. 1993. Specific intravenous carbohydrate therapy. A new concept in inhibiting antibody-mediated rejection--experience with ABO-incompatible cardiac allografting in the baboon [J]. *Transplantation*, **56**(4): 769-777.

Doxiadis GG, Otting N, Antunes SG, de Groot NG, Harvey M, Doxiadis II, Jonker M, Bontrop RE. 1998. Characterization of the ABO blood group genes in macaques: evidence for convergent evolution [J]. *Tissue Antigens*, **51**(4 Pt 1): 321-326.

Galili U. 2006.Xenotransplantation and ABO incompatible transplantation: the similarities they share [J]. *Transfus Apher Sci*, **35**(1): 45-58.

Rieben R, Buchs JP, Fluckiger E, Nydegger UE. 1991. Antibodies to histo-blood group substances A and B: Agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories [J]. *Transfus* (Paris), **31**(7): 607-615.

Rieben R, Frauenfelder A, Nydegger U E. 1992. Naturally occurring ABO antibodies: Long-term stable, individually distinct anti-A IgG spectrotypes [J]. *Eur J Immuno*l, **22**(8): 2129-2133.

Stussi G, Huggel K, Lutz HU, Schanz U, Rieben R, Seebach JD. 2005. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method [J]. *Br J Haematol*, **130**(6): 954-963.

Tanabe K. 2007. Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey [J]. *Transplantation*, **84**(12 Suppl): S13-16.

Terao K, Fujimoto K, Cho F, Honjo S. 1981.Detection of ABO group-specific substances on the red cells of the cynomolgus monkey [J]. *Jpn J Med Sci Biol*, **34**(1): 1-7.

Terao K, Hiyaoka A, Cho F, Honjo S. 1988. The simian-type M and the human-type ABO blood groups in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*): their inheritance, distribution and significance for the management of a breeding colony [J]. *Lab Anim*, **22**(4): 347-354.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 62−65 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01062

精神分裂症易感基因 DKK4 与中国人群大脑容量的相关性



张丽华[1]，李 明[2,3]，施晓东[4]，任 惠[1]，宿 兵[2,*]，徐 忠[5,*]

(1. 昆明医学院第一附属医院 干部医疗科，云南 昆明 650031；
2. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室，云南 昆明 650223；
3. 中国科学院研究生院，北京 100049；4. 曲靖师范学院 生物资源与环境科学学院，云南 曲靖 655011；
5. 昆明医学院第一附属医院 神经内科，云南 昆明 650031)

摘要：精神分裂症是一种复杂的精神疾病，全世界约有 1%的人患有这种疾病。以往的研究发现，精神分裂症患者的脑容量比正常人小，且一些精神分裂症易感基因的 DNA 序列多态性也同时与脑的结构异常有关，这与精神分裂症的神经发育假说是吻合的。最近研究发现，人的 DKK4 基因的 SNP(rs2073665)与精神分裂症显著相关。为了研究 DKK4 精神分裂症易感 SNP 是否与脑发育相关，本文检测了 961 个正常人 rs2073665 的基因型并测量了他们的脑容量。相关性分析发现，rs2073665 在加性模型下和显性模型下都与脑容量存在显著相关性，这为精神分裂症易感基因同时能影响脑容量提供了证据，同时也为精神分裂症的神经发育异常假说提供了佐证。

关键词：精神分裂症；脑容量；DKK4；单核苷酸多态性
中图分类号：Q987.2；Q593.2；R749.3 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0062-04

Association of the schizophrenia susceptible gene DKK4 with brain volume in Chinese populations

ZHANG Li-Hua[1], LI Ming[2,3], SHI Xiao-Dong[4], REN Hui[1], SU Bing[2,*], XU Zhong[5,*]

(1. *Department of Geratology*, *The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College*, *Kunming* 650031, *China*; 2. *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution*, *Kunming Institute of Zoology and Kunming Primate Research Center*, *Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*; 3. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*; 4. *Biological Resources and Environmental Science College*, *Qujing Normal University*, *Qujing* 655011, *China*; 5. *Department of Neurology*, *The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College*, *Kunming* 650031, *China*)

Abstract: Schizophrenia is one of the most severe mental disorders with a worldwide incidence of 1%. Previous studies suggested that the brain volumes of the schizophrenia patients were much smaller than the healthy individuals and many schizophrenia susceptible genetic variants have been shown associated with structural brain abnormalities in patients, which is consistent with the neurodevelopmental hypothesis of the etiology of schizophrenia. Recently, the DKK4 gene involved in the Wnt signaling was found to be significantly associated with schizophrenia. To test whether DKK4 is associated with neurodevelopment, we genotyped one DKK4 SNP in 961 healthy Chinese individuals and measured their brain volumes. We found that the SNP was significantly associated with brain volume under both additive and dominant genetic models, providing evidence that schizophrenia susceptible genes could influence brain volume. Our findings support the neurodevelopmental hypothesis of the etiology of schizophrenia.

Key words: Schizophrenia; Brain volume; DKK4; Single nucleotide polymorphism (SNP)

精神分裂症是一种严重的精神疾病，全世界约有 1%的人患有这种疾病 (Jablensky et al, 1987)。目前关于精神分裂症发病机制的研究虽然很多，但仍然不是很清楚。目前累积的数据表明，主要有几种可能的机制，包括神经发育异常假说、多巴胺假说、谷氨酸假说、γ−氨基丁酸能假说以及免疫假说等

收稿日期：2010-08-17；接受日期：2010-11-10
*通讯作者(Corresponding authors)，E-mail: xz2006951@yahoo.cn; sub@mail.kiz.ac.cn

等 (Lang et al, 2007)。其中, 神经发育异常假说是目前比较被研究者接受的假说。这个假说的核心是精神分裂症源于个体发育早期异常, 如出生前和出生后的很多有害事件(如母亲营养状况异常和病毒感染等)能显著增加精神分裂症的发病率。神经发育异常假说还得到了大量来自精神分裂症患者脑形态学研究的支持。研究发现相对于正常人, 精神分裂症患者的脑容量 (Cahn et al, 2002)、灰质体积 (Lawrie & Abukmeil, 1998)以及海马区都有不同程度的减小 (Velakoulis et al, 1999)。此外, 大脑的其它区域, 如白质、左侧上颞叶回等在精神分裂症患者中也呈减小趋势 (Honea et al, 2005)。

研究表明, 很多精神分裂症的易感基因与正常人的脑容量或者脑内结构有关, 这与精神分裂症的神经发育异常假说是吻合的 (Ho et al, 2005,2007)。人的 DKK4 基因(也称 Dickkopf homolog 4 基因)位于第 8 号染色体的 8p11.2-p11.1 区域。它编码一个 181 个氨基酸的蛋白质。DKK4 作为 Wnt 蛋白的抑制因子, 参与 Wnt 信号通路的转导, 进而调控细胞分化和凋亡等 (Mao et al, 2002)。最近, Proitsi et al (2008) 研究发现 DKK4 基因中的单核苷酸多态性位点 rs2073665 在中国人群中与精神分裂症显著相关。为了验证神经发育异常假说, 并进一步揭示 DKK4 的致病机理, 我们在 961 个中国健康人群中研究了 DKK4 与脑容量变化的相关性。

1　材料和方法

1.1　样　本

在本次研究中, 我们一共收集了 961 个正常成年人的血液样本, 包扩 442 个男性和 519 个女性。大部分的样本为汉族, 少数来自 14 个西南少数民族群体。所有的样本均从云南采集, 所有的个体均提供了知情同意书。我们同时收集了患者的相关信息, 比如脑容量、身高、体重和年龄等。这些样本年龄均为 19 岁到 28 岁。

1.2　基因分型

我们采集了每个志愿者的血样, 并用酚氯仿的方法抽提了基因组的 DNA。对于 SNP 位点的选择, 我们首先在 Hapmap 的数据库里分析了 DKK4 在中国人群中的连锁图, 发现所有的 SNP 位点高度连锁 (图 1)。因此, 我们选择了被报道过与精神分裂症相关的位点 rs2073665 作为我们的候选位点。 通过 PCR(聚合酶链式反应)的方法扩增 rs2073665 的 DNA 片段。rs2073665 的正反引物分别是 5'-CTGCGAATGCTGTTCTTACCCTT-3'和 5'- CAACAGCTCTTGCCAATGACTTG-3', 反应条件为预变性 95℃ 5 min, 变性 95℃ 30 s, 退火 58℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 共 45 个循环, 延伸 72℃ 10 min。基因分型采用的是 ABI (Applied Biosystems) 公司的 SNaPShot 的方法, 并在 3130 测序仪上完成。我们通过 GeneMapper 4.0 软件自动读取基因分型结果, 并人工检查校正。

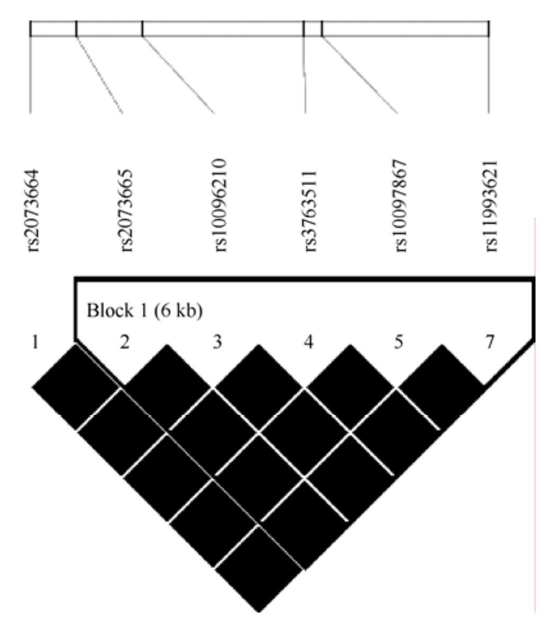


图 1　DKK4 基因在 HapMap 数据库中国北京人群(CHB)中的遗传连锁图

Fig. 1　The LD map of DKK4 in Han Chinese from Beijing (CHB), data obtained from Hapmap database

图中 SNP 的位置位于第 8 号染色体的 42231586 到 42239674 区域之间, 共有 7 个 SNP。其中 SNP6 在 CHB 中没有多态性, 其余 6 个 SNP 高度连锁。采用 D'计算该区域 SNP 间的连锁关系。

All 7 SNPs are located between chromosome 8: 42231586−42232489, in which SNP6 shows no polymorphism in CHB and all the other 6 SNPs are in high linkage. The linkage disequilibrium (LD) was calculated using D' algorithm.

1.3　脑容量的测量

通过测量头颅体积的方法来间接测量脑容量, 分别测量 3 个主要的测量指标：颅长(L, 从眉间点到枕骨隆突的距离); 颅宽(B, 顶骨宽, 两个顶节之间的距离); 颅高(H, 从内耳道到头颅最高点的距离)。头颅容积的计算采用由 Willianms et al (1995) 提出的公式：男性, 0.337 (L-1.1)(B-1.1)(H-1.1) + 406.01 mL; 女性, 0.400 (L-1.1)(B-1.1)(H-1.1) + 206.60 mL。

表 1 SNP rs2073665 的特征及等位基因频率

Tab. 1 Characters and allele frequencies of SNP rs2073665

SNP	染色体位置 Chromosome location	等位基因 Alleles	低频等位基因 Minor allele	低频等位基因频率 Minor allele frequency (%)
rs2073665	chr8: 42232489	A/G	G	12.05

表 2 SNP rs2073665 与脑容量的相关性分析的 *P* 值

Tab. 2 *P* values of the association tests of SNP rs2073665 with brain volume

SNP	加性模型 Additive model			显性模型 Dominant model
	总的样本 All	男性 Males	女性 Females	总的样本 All
rs2073665	0.02213	0.1584	0.1214	0.01461

表 3 SNPrs2073665 三种基因型(GG, GA, AA)个体的平均脑容量

Tab. 3 Average cranial volumes of individuals with three different genotypes (GG, GA, AA) at SNP rs2073665

SNP		基因型 Genotype		
rs2073665	基因型 Genotype	GG	GA	AA
	个体数目 Individual counts	14	202	745
	平均脑容量 Average cranial volumes (mL)	1 296	1 305	1 283
	标准差 Standard deviation (mL)	98.89	112.4	109

1.4 数据分析

哈迪温伯格平衡检验采用软件 PLINK (Purcell et al, 2007)完成。SNP 和脑容量的相关性分析采用 PLINK (Purcell et al, 2007)软件进行分析。在分析中，我们采用线性模型来分析每个 SNP 的加性效应，即分别将两种纯合的基因型赋值为 0 和 2，而将杂合的基因型赋值为 1，并统计基因型和脑容量的相关性。我们分别在 3 种遗传模型 (加性模型、显性模型和隐形模型)下分析了 DKK4 与脑容量的相关性。

2 结 果

2.1 SNP 特征及哈迪温伯格平衡检验

我们选取了 DKK4 基因在 Proitsi et al (2008)的研究中和精神分裂症显著相关的 SNP 位点(rs2073665)来检测它是否也和脑容量有关。rs2073665 位于 DKK4 基因的内含子中。rs2073665 的每个基因型的频率见表 1。经过检验，rs2073665 符合哈迪温伯格平衡。

2.2 相关性分析

我们用线性回归的方法检测 rs2073665 在加性模型下是否与脑容量相关。当用所有样本来统计时，rs2073665 与脑容量显著相关(P=0.02213)(表 2)，每种基因型个体对应的平均脑容量数据见表 3。为了检验这个 SNP 是否存在性别特异性的相关性，我们将男性样本和女性样本分别进行统计，分析发现单独的男性样本和女性样本都不和脑容量相关(表 2)。

为了进一步研究 rs2073665 与脑容量的相关性，我们也分别在显性模型和隐性模型下检测了它们的相关程度。我们发现，在显性模型下，即携带 G 等位基因的基因型(GG 和 GA)个体对应的脑容量比基因型 AA 个体对应的脑容量大很多，相关程度已达到显著(P=0.01461)(图 2)。在 Proitsi et al (2008)的研究中，报道了 rs2073665 的 A 等位基因为疾病易感基因，这与我们的研究结果是一致的，即易感基因型对应较小的脑容量，也证实了神经发育异常假说。

据报道，身高和体重是和脑容量紧密相关的(Ho et al, 1980)，在我们所用的样本中，身高和体重也与脑容量紧密相关(P<0.001)，这和前人的结果是一致的。为了排除身高和体重的因素对 rs2073665 和脑容量的相关性影响，我们引入身高和体重作为协变量，分析发现，rs2073665 经过身高和体重矫正

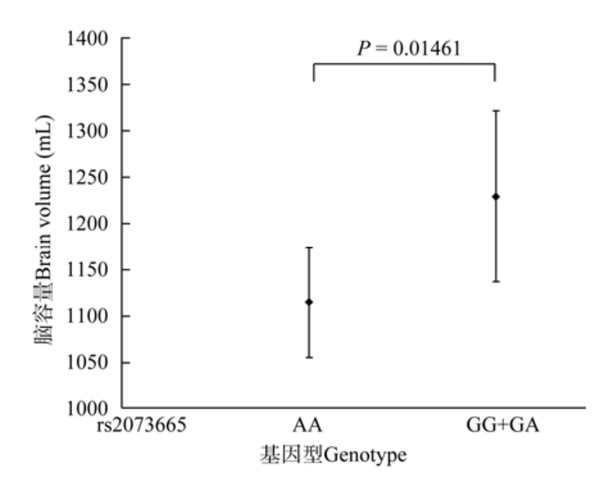


图 2 SNP rs2073665 在显性模型下与脑容量的相关性

Fig. 2 Association of SNP rs2073665 with brain volume under dominant genetic model

后仍与脑容量相关(P<0.05), 从而排除了由身高、体重带来检验误差的可能性。

3 讨 论

本研究以 961 个中国人为样本, 研究了 DKK4 基因中与精神分裂症相关的关键 SNP 位点 rs2073665 与脑容量的相关性, 研究结果显示 DKK4 基因与脑容量存在显著的相关性, 这为精神分裂症易感基因同时也能影响脑容量的假说提供了证据。

越来越多的证据显示, 神经发育异常假说可能是精神分裂症的关键诱因, 其核心内容是早期的发育异常导致神经系统的发育紊乱, 包括脑容量减少和脑区连接的紊乱, 最终导致精神分裂症的发生。此外, 研究表明, 精神分裂症患者的智力、工作记忆、概念组织和语言加工等与正常人相比都发生了异常, 而脑容量已被证明与这些特征呈正相关, 这些结果表明脑容量减少可能也是精神分裂症患者的临床特征之一。目前, 大量的研究结果也证实了这个假说 (Rimol et al, 2010; Steen et al, 2006)。

DKK4 是 Wnt 信号通路的抑制因子, 它通过与 Wnt 蛋白的膜受体 LRP6 结合从而抑制 Wnt 蛋白与 LRP6 的结合, 影响 Wnt 信号通路, 最终导致 Wnt 信号通路下游的基因表达变化, 调控细胞的正常生理功能, 如细胞的分化、增殖、迁移和凋亡等。大量的证据表明 Wnt 信号通路参与神经系统的发育 (Clevers, 2006; Fuerer et al, 2008; Logan & Nusse, 2004), 信号通路中的关键基因异常都可能会导致神经系统发育异常, 进而导致疾病的发生 (Proitsi al et, 2008; Yang et al, 2003)。

总之, 我们的结果证实了精神分裂症易感基因 DKK4 在中国人群中与脑容量存在显著的相关性, 这为精神分裂症的神经发育异常假说提供了强有力的证据。

致谢：感谢为本研究开展提供 DNA 样本的志愿者。感谢中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验的张慧和李燕皎在实验方面的技术支持。本实验结果分析过程中得到马杰、何灵江等的帮助, 在此一并致谢。

参考文献：

Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, van der Linden JA, Schothorst PF, van Engeland H, Kahn RS. 2002. Brain volume changes in first-episode schizophrenia: A 1-year follow-up study [J]. *Arch Gen Psychiatry,* **59**(11): 1002-1010.

Clevers H .2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease [J]. *Cell,* **127**(3): 469-480.

Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D. 2008. Wnt signalling in development and disease. Max Delbruck Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease [J]. *EMBO Rep,* **9**(2): 134-138.

Ho BC, Andreasen NC, Dawson JD, Wassink TH. 2007. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met gene polymorphism and progressive brain volume changes in schizophrenia [J]. *Am J Psychiatry,* **164**(12): 1890-1899.

Ho BC, Wassink TH, O'Leary DS, Sheffield VC, Andreasen NC. 2005. Catechol-O-methyl transferase Val158Met gene polymorphism in schizophrenia: Working memory, frontal lobe MRI morphology and frontal cerebral blood flow [J]. *Mol Psychiatry,* **10**(3): 229, 287-298.

Ho KC, Roessmann U, Straumfjord JV, Monroe G. 1980. Analysis of brain weight. II. Adult brain weight in relation to body height, weight, and surface area[J]. *Arch Pathol Lab Med,* **104**(12): 640-645.

Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. 2005. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: A meta-analysis of voxel-based morphometry studies[J]. *Am J Psychiatry*, **162**(12): 2233-2245.

Jablensky A, Sartorius N, Korten A, Ernberg G, Anker M, Cooper JE, Day R. 1987. Incidence worldwide of schizophrenia [J]. *Br J Psychiatry,* **151**: 408-409.

Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. 2007. Molecular mechanisms of schizophrenia[J]. *Cell Physiol Biochem,***20**(6): 687-702.

Lawrie SM, Abukmeil SS 1998. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies [J]. *Br J Psychiatry,* **172**: 110-120.

Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol,* **20**: 781-810.

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/β-catenin signaling [J]. *Nature,* **417**(6889): 664-667.

Proitsi P, Li T, Hamilton G, Di Forti M, Collier D, Killick R, Chen R, Sham P, Murray R, Powell J, Lovestone S. 2008. Positional pathway screen of wnt signaling genes in schizophrenia: association with DKK4 [J]. *Biol Psychiatry,* **63**(1): 13-16.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses [J]. *Am J Hum Genet,* **81**(3): 559-575.

Rimol LM, Hartberg CB, Nesvåg R, Fennema-Notestine C, Hagler DJ Jr, Pung CJ, Jennings RG, Haukvik UK, Lange E, Nakstad PH, Melle I, Andreassen OA, Dale AM, Agartz I. 2010. Cortical thickness and subcortical volumes in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Biol Psychiatry,* **68**(1): 41-50.

Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies [J]. *Br J Psychiatry,* **188**: 510-518.

Velakoulis D, Pantelis C, McGorry PD, Dudgeon P, Brewer W, Cook M, Desmond P, Bridle N, Tierney P, Murrie V, Singh B, Copolov D. 1999. Hippocampal volume in first-episode psychoses and chronic schizophrenia: a high-resolution magnetic resonance imaging study [J]. *Arch Gen Psychiatry,* **56**(2): 133-141.

Yang J, Si T, Ling Y, Ruan Y, Han Y, Wang X, Zhang H, Kong Q, Li X, Liu C, Zhang D, Zhou M, Yu Y, Liu S, Shu L, Ma D, Wei J, Zhang D. 2003. Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia [J]. *Biol Psychiatry,* **54**(11): 1298-1301.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 66−69 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01066

野生中缅鼩病毒携带情况的初步调查



王新兴，李婧潇，王文广，孙晓梅，何春艳，代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所，云南 昆明 650118)

摘要：病毒学检测和监测是树鼩实验动物化和质量控制的重要标准和依据，而野生中缅树鼩是否携带人兽共患病毒鲜见报道。本研究采用酶联免疫吸附(ELISA)方法，对来源于云南昆明市城郊青龙峡地区的野生树鼩是否携带单纯疱疹病毒、轮状病毒、流感病毒、柯萨奇病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、出血热病毒和麻疹病毒等 11 种常见病毒进行筛查。结果表明，在已筛查的 60 只野生中缅树鼩中，可检测到单纯疱疹病毒和柯萨奇病毒，其血清抗体阳性比例分别为 36.7% (22/60) 和 1.67% (1/60)，而在粪便中仅检测到轮状病毒，其抗原阳性为 6.7% (4/60)，未检测到其他病毒，初步显示了野生树鼩自然状态下携带病毒的状况。为此，建议将单纯疱疹病毒、柯萨奇病毒和轮状病毒列为普通级树鼩病毒质量控制的首检项目，进一步大样本筛查将显示是否将其他病毒列为必检项目。

关键词：中缅树鼩；病毒监测；酶联免疫吸附试验
中图分类号：Q95-33; R373; Q959.832 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0066-04

Preliminary investigation of viruses to the wild tree shrews (*Tupaia belangeri chinese*)

WANG Xin-Xing, LI Jing-Xiao, WANG Wen-Guang, SUN Xiao-Mei, HE Chun-Yan, DAI Jie-Jie*

(*Institute of Medical Biology*, *Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College*, *Kunming Yunnan* 650118, *China*)

Abstract: Virological testing and monitoring is a fundamental part of quality control of experimental animals. However, there are few papers regarding the spectrum and status of natural infection in wild tree shrews with human and animal pathogenic viruses. Using enzyme-linked immunosorbent adsorption assay (ELISA), we tested sixty wild tree shrews captured from Qinglong, an outskirt region of Kunming, Yunnan Province, China for eleven viruses, including herpes simplex virus, coxsackie virus, influenza virus, HAV, HBV, HCV, HDV, dengue virus, hemorrhagic fever virus and measles virus. Our results showed that, in the serum samples, 22/60 (36.7%) and 1/60 (1.67%) were antibody positive for herpes simplex virus and coxsackie virus, respectively, and 4/60 (6.7%) were antigen positive for rotavirus in the feces. The remaining species of viruses were negative in these tree shrews. Based on these results, we propose that herpes simplex virus, coxsackie virus and cotavirus should be listed as top priority for routine virological monitoring of tree shrews.

Key words: Tree shrew (*Tupaia belangeri chinese*); Viruses; Virological monitoring; ELISA

树鼩 (*Tupaia belangeri*, tree shrew)是一种形似松鼠的小型哺乳动物，主要生活于热带和亚热带森林、灌丛、村落附近，在东南亚和我国的云南、广西、海南、贵州等地有较多分布。树鼩在进化地位上介于灵长目和食虫目之间，曾被划分为原始灵长类动物，在新陈代谢和大体解剖上比犬、鼠等实验动物更接近人类，可以罹患多种人类疾病，并具有体形小，繁殖快，经济低廉，易驯养和饲育等优点，因此，作为一种新型的实验动物资源正在越来越受到重视 (Xu et al, 2005)。

目前国内科研所使用的树鼩多为野外捕获，实验动物的质量难以保证，其自然携带病毒尚不清楚，

收稿日期：2010-12-01；接受日期：2011-01-26
基金项目：“十一五”国家科技支撑重点计划项目(2009BAI83b02)；云南省科技基础条件平台建设计划项目(2006PT07-2)
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: djj@imbcams.com.cn
第一作者简介：王新兴(1986–)，男，硕士研究生，研究方向：医学实验动物学；E-mail：wxxing666@163.com

而许多情况下这些病毒对试验又存在干扰, 所得到实验结果的可比性、准确性、可重复性等问题有待商榷。将野生树鼩进行人工驯化、饲养、繁殖与规范化管理, 对其携带的微生物学、寄生虫学和病毒学指标进行控制, 建立达到质量标准的树鼩种群, 使其成为新的实验动物品种势在必行 (He, 2010)。目前树鼩人工驯化以及繁育的关键技术已经解决, 对树鼩病毒的质量控制却仍是一项重要的内容。确立普通级树鼩的病毒检测标准, 首先应排除人兽共患病, 因其不仅会对动物的健康和实验结果造成影响, 而且会对实验动物工作者和动物实验人员的人身健康和生命安全造成威胁。本研究参考啮齿类、家兔和灵长类动物等实验动物病毒检测国家标准 (GB14922-94[S] 和 GB/T14926.1-14926.41-94[S]), 结合已报道的树鼩研究文献资料, 选取了 11 种人兽共患病病毒, 对从昆明青龙峡地区捕获的的 60 只野生中缅树鼩, 进行病毒携带状况的调查, 可为今后树鼩实验动物化的质量控制标准和病毒检测指标的建立提供参考。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物

从云南昆明青龙峡地区捕获的野生树鼩随机挑选 60 只, 雌雄数目各 30 只。在分类学上属于中缅树鼩滇西亚种 (*Tupaia belangeri chinese*), 。

1.1.2　主要仪器

37°恒温箱、高速冷冻离心机(SIGMA 3K30)、酶标仪(Bio Tek Power Wave XS2)、精密移液器等。

1.1.3　试剂盒

乙肝表面抗原、e 抗原检测试剂盒、丙肝抗体检测试剂盒(KHB 上海科华生物工程股份有限公司); 柯萨奇病毒、甲肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、流感病毒和麻疹病毒抗体 IgG 酶联免疫分析试剂盒 (美国 R&D 公司); 出血热病毒 (中国药品生物制品检定所); 优生优育“TORCH”项目 HSV(1+2 型) IgM 抗体一步法酶联免疫试剂盒、轮状病毒抗原检测盒 (深圳市安群生物工程有限公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　标本采集及处理

采集 60 只野生树鼩的血标本, 从尾静脉或股动脉采血 1.5 mL, 37℃恒温箱静置约 3 h, 高速离心机 6000 r/min 离心 15 min。将分离后的血清进行合理分装, 保证每次检测所需的最小血清量, 并放入 –20℃冰箱保存待检, 避免反复冻融; 用无菌 Eppendorf 小管收集 60 只野生树鼩的粪便, 加人 PBS 缓冲液配成 20% 悬液, 经 4500 r/min 离心 20 min, 取上清液用于轮状病毒的检测。

1.2.2　诊断试剂盒检测

严格按照各个试剂盒的说明书进行操作。

1.2.3　数据读取及分析处理

完成操作后, 经 Bio Tek Power Wave XS2 酶标仪进行检测, 应用 Gen5 连续酶标分析软件进行数据分析和处理。根据说明书提供的结果判定标准, 判断实验的有效性和每个样本的阴阳性, 并记录。

2　结　果

2.1　血液标本的检测结果

单纯疱疹病毒抗体有 22 例呈阳性，阳性率为 36.7% (22/60); 柯萨奇病毒抗体出现 1 例阳性, 阳性率为 1.67% (1/60); 流感病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、出血热病毒、麻疹病毒等 7 种病毒的检测结果全为阴性, 见表 1。

表 1　野生树鼩血清病毒检测结果

Tab. 1　The results of virus antibody in wild tree shrew

病毒名称 Virus names	样本总数 Total samples	阳性例数 Positive number	阳性率(%) Positive rate
单纯疱疹病毒 Herpes simplex virus	60	22	36.7
流感病毒 Influenza virus	60	0	0
柯萨奇病毒 Coxsackie virus	60	1	1.67
甲肝病毒 Hepatitis A virus	60	0	0
乙肝病毒表面抗原 Hepatitis B virus surface antigen	60	0	0
乙肝病毒 e 抗原 Hepatitis B virus e antigen	60	0	0
丙肝病毒 Hepatitis C virus	60	0	0
丁肝病毒 Hepatitis D virus	60	0	0
登革热病毒 Dengue virus	60	0	0
出血热病毒 Hemorrhagic fever virus	60	0	0
麻疹病毒 Measles virus	60	0	0

2.2 粪便标本的检测结果

对轮状病毒采用粪便标本检测抗原, 60份样本中4例呈阳性, 阳性率为6.7% (4/60), 见表2。

表2 野生树鼩粪便病毒抗原检测结果

Tab. 2 The results of viral antigens in wild tree shrew feces

病毒名称 Virus names	样本总数 Total samples	阳性例数 Positive number	阳性率 (%) Positive rate
轮状病毒 Rotavirus	60	4	6.7

3 讨 论

3.1 树鼩在病毒学中的应用

随着非人灵长类实验动物资源的日益稀贵和实验动物小型化的发展趋势, 树鼩作为新兴的动物实验对象, 在人类重大疾病和重大传染病研究领域已经呈现广泛的前景, 尤其是在病毒性疾病方面。近半个世纪以来, 国内外陆续有对树鼩疱疹病毒、登革热病毒、肝炎病毒、轮状病毒、单纯疱疹病毒、登革热病毒等病毒的易感性研究 (Hu & Li, 2002), 但这些是人工感染状态下的研究，而野生树鼩是否会自发感染这些人兽共患病值得调查。从本研究结果来看, 单纯疱疹病毒、轮状病毒和柯萨奇病毒发现了阳性结果, 提示这3种病毒在树鼩自然种群中的存在感染状况。Wan et al (1982, 1985) 用含有轮状病毒的患儿的粪便灌注给笼养成年树鼩, 观察其发病情况、病理学、病原学和血清学，发现成年树鼩可感染人轮状病毒, 其可能是一种人轮状病毒易感的动物。此研究有助于轮状病毒性感染的发病和免疫机理、药物筛选以及疫苗制备和检定的研究, 从而加快控制轮状病毒感染的进程。Daral et al (1980) 用Ⅰ型与Ⅱ型单纯疱疹病毒 (HSV-1, HSV-2) 感染树鼩, 发现幼龄树鼩对HSV易感, 感染后出现了类似疱疹病毒肝炎的表现, 肝脏与脾脏出现高滴度的病毒。随后他们发现成年树鼩也可感染 HSV 而发病, 但对某些毒株有抵抗力, 并且感染HSV后存活的动物则可不再第二次感染 (Hu & Li, 2002)。本研究结果可与上述文献报道相呼应, 而目前尚未见树鼩人工感染柯萨奇病毒的研究, 其易感性也尚不明确。

3.2 树鼩病毒检测问题

目前研究发现, 树鼩有望成为良好的病毒性肝炎动物模型 (Chen et al, 2008)。因此, 作者对树鼩进行 4 种肝炎病毒的筛查, 但是都未发现阳性结果。其余几种病毒的筛查结果也为阴性。这可能与样本量较小、野生中缅树鼩来源地单一等因素有关, 从流行病学角度上讲, 并不能有效说明野生中国树鼩对这几种病毒易感性问题和感染率状况。

从方法学上来看, 采用ELISA方法对树鼩携带的病毒进行检测, 简便快捷, 并具有可应用于大批常规检测的特点, 是实验动物病毒检测国家标准推荐的血清学检测方法之一。但由于ELISA检验方法本身固有的局性, 以及实验所采用的试剂盒均为人的病毒检测商品试剂盒 (目前尚未研发出针对树鼩的病毒检测试剂盒), 其检测结果的特异性和准确性有待进一步完善。提高ELISA方法的特异性和灵敏度, 研发标准化的树鼩病毒检测试剂盒将是重要的研究内容。

总之, 建立实验动物化的树鼩病毒检测标准, 一方面要更广泛的调查树鼩的病毒感染状况和流行病学调查; 另一方面, 要建立树鼩实验动物化的病毒检测的方法和技术标准, 并不断提高检测方法的灵敏性和特异性，对树鼩以新型实验动物角色在生物医学研究和人类健康领域发挥更大作用具有重要的意义。

参考文献:

Chen J, Dai JJ, Sun XM. 2008. Advances in the use of tree shrews as animal models for hepatitis research[J]. *Chin J Compar Med*， 18(2): 59-62. [陈瑾, 代解杰, 孙晓梅. 2008. 树鼩肝炎动物模型的研究进展.中国比较医学杂志. 18(2): 59-62.]

Daral G, Zöller L, Matz B, Schwaier A, Flügel RM, Munk K. 1980. Experimental infection and the state of viral latency of adult *Tupaia* with herpes simplex virus tape 1 and 2 and infection of juvenile *Tupaia* with temperature-sensitive mutants of HSV type 2[J]. *Arch Virol*, 65: 311-318.

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 2002. GB/T14926.1-14926.41-2001[S]. 实验动物微生物学检验方法. 北京：中国国家标准化管理委员会.

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 2002. GB14922.2-2001[S]. 实验动物微生物学等级及监测. 北京：中国国家标准化管理委员会.

He ZM. 2010. Potentials and prospects: Laboratory animal derived from resource animals in China[J]. *Chin J Compar Med*, 20(3): 1-7. [贺争鸣. 2010. 我国资源动物的实验动物化潜力与展望. 中国比较医学杂志, 20(3): 1-7.]

Hu XL, Li JQ. 2002. Application of *Tupaia* on studying of virus disease[J].

Virol Sin, 17(3): 276-278. [胡溪柳, 李际强. 2002. 树鼩应用于病毒学方面的研究进展. 中国病毒学, 17(3): 276-278.]

Wan XB, Pang QF, Qiu FX, Xu AY, Zhang SQ. 1982. Experimental infection of human rotavirus of adult tree shrew[J]. *J Med Res*, **3**: 2. [万新邦, 庞其方, 丘福禧, 胥爱源, 张胜泉. 1982. 人轮状病毒实验感染成年树鼩的研究. 医学研究杂志, **3**: 2.]

Wan XB, Pang QF, Qiu FX, Zhang XS, Liu JC, Xv AY, Zhang SQ, Zhang HF, Xu WM..1985.Experimental studies on the susceptibility of adult *Tupaia belangeri yunalis* to human rotavirus[J].*Chin J Microbiol Immunol*,**5**:304-307.［万新邦, 庞其方, 丘福禧, 张新生, 刘巩昌, 胥爱源, 张胜泉, 张惠芬, 徐维民.1985.成年的中国云南树鼩对人轮状病毒易感性的实验研究. 中华微生物学和免疫学杂志, **5**:304-307.］

Xu XP, Chen HB, Ben KL. 2005. Application of tree shrew as an animal model in biomedical research[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 13(3): 187-190. [徐新平, 陈红波, 贲昆龙. 2005. 树鼩在医学生物学中的应用. 中国实验动物学报, 13(3): 187-190.]

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 70−80
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01070

BACK

Progress of non-human primate animal models of cancers

XIA Hou-Jun, CHEN Ce-Shi*

(*Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China*)

Abstract: Cancer is the second leading disease causing human death. Pre-clinical *in vivo* studies are essential for translating *in vitro* laboratory research results into the clinic. Rodents, including the mouse and rat, have been widely used for pre-clinical studies due to their small size, clear genetic backgrounds, rapid propagation, and mature transgenic technologies. However, because rodents are evolutionarily distinct from humans, many pre-clinical research results using rodent models cannot be reproduced in the clinic. Non-human primates (NHPs) may be better animal models than rodents for human cancer research because NHPs and humans share greater similarity in regards to their genetic evolution, immune system, physiology and metabolism. This article reviews the latest progress of cancer research in NHPs by focusing on the carcinogenesis of different NHPs induced by chemical and biological carcinogens. Finally, future research directions for the use of NHPs in cancer research are discussed.

Key words: Non-human primate; Cancer; Tree shrew

非人灵长类肿瘤模型研究进展

夏厚军, 陈策实*

(中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223)

摘要：癌症是人类第二大致死的疾病。将体外细胞模型获得的癌症研究结果向临床转化过程中, 动物活体实验是必不可少的一个环节。现在的肿瘤活体实验绝大部分采用啮齿类实验动物如小鼠和大鼠, 这是因为它们具有个体小、繁殖迅速、遗传背景清楚、转基因技术成熟等优势。但是啮齿类和人的亲缘关系比较远, 许多从啮齿类动物模型获得的研究结果不能在人体重现。非人灵长类动物在遗传进化、免疫、生理和代谢等诸多方面与人类高度近似, 理论上更加适合癌症研究。本文对现有的非人灵长类肿瘤研究做一综述, 主要集中介绍用化学和生物致癌剂在不同的非人灵长类动物诱导肿瘤的研究, 为将来用非人灵长类动物研究人类癌症奠定基础。

关键词：非人灵长类; 肿瘤; 树鼩
中图分类号：R-332; Q959.832 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0070-11

Rodents are popular animal models for human cancer research because of their small size, rapid propagation, low cost, the availability of a variety of inbred strains, and transgenic techniques. However, most anti-tumor drugs that cure cancers in rodent models failed in clinical trials because of a lack of efficacy or the presence of toxicity. It is estimated that only 3.8% of patients in phase-I cancer drug trials between 1991 and 2002 achieved an objective clinical response although all drugs worked well against cancer in the mouse (Roberts et al, 2004). This deficiency can be largely attributed to species differences between rodents and humans. Therefore, better animal models are required to increase the success rate for the discovery of anti-cancer drugs and treatments.

Compared to rodents, non-human primates (NHPs) are more similar to humans in regards to their genetic evolution, anatomy, physiology, biochemistry and organ

Received date: 2010-12-14; Accepted date: 2011-01-07
Foundation items: This work was supported in part by a grant from Yunnan Province High-Profile Talent Project (云南省高端人才计划 2010CI114), and grants from Chinese Academy of Sciences (Basic frontier project , KSCX2-EW-J-23)
* Corresponding author (通信作者), Email: chenc@mail.kiz.ac.cn
收稿日期：2010-12-14；接受日期：2011-01-07

systems. It has been shown that almost all human cancer genes are highly conserved between chimpanzees and humans (Puente et al, 2006). However, the use of NHPs in cancer research is limited because they are rare, expensive, and of a large size. In addition, cancer incidence in NHPs is very low. In this article, we summarize results on spontaneous and experimentally induced tumors in NHPs and discuss future study directions for using NHPs in cancer research.

1 Spontaneous tumors in NHPs

Spontaneous tumors have been observed in NHPs bred in zoos and research institutions all over the world. By 1989, a total of 783 spontaneous tumors in monkeys and apes had been reported (Beniashvili, 1989). From 1989 to 2000, 1 388 cases of benign and malignant tumors (582/806) in NHPs were found (Huang & Cheng, 2002). Most tumors were found in baboons (Cianciolo & Hubbard, 2005) and macaques because these two species were more commonly used for research than other NHP species (Beniashvili, 1989).

The incidence of spontaneous tumors in NHPs depends on the animal species, sex and age. Autopsy records of 373 breeders and normal controls from the National Cancer Institute (NCI), USA showed a very low incidence of spontaneous malignant tumors in cynomolgus (1.5%) and rhesus (2.8%) monkeys, but a considerably higher incidence in African green monkeys (8%) (Thorgeirsson et al, 1994). Most types of spontaneous tumors occurred equally in male and female NHPs. However, spontaneous tumors of the reproductive system were primarily observed in older females and rarely observed in males (Huang & Cheng, 2002). The incidence of spontaneous tumors was approximately 5% in all age groups in NHPs but increased in frequency with age, similar as it does in humans (Beniashvili, 1989; Bunton & Bacmeister, 1989; Yamate et al, 2007; Starost, 2009). For example, the incidence of colon cancer in rhesus monkeys increased with age (Uno et al, 1998). It is worth pointing out that some tumors were observed in infant and young animals (Jayo et al, 1988; Pellegrini et al, 2009).

The spontaneous tumor spectrum in NHPs is very similar to that in humans. For example, nasopharyngeal carcinomas, hepatocellular carcinomas (HCC), renal carcinomas, melanoma, pulmonary neoplasms, and other tumors were reported in chimpanzees (Bailey, 2009). Tumors of the digestive system, reproductive system, and urinary system were more common than those of other organ systems (Beniashvili, 1989). It is clear that while tumors of the respiratory system are rare in NHPs, they are common in humans due to air pollution and smoking (Coggins, 2007). Although the tumor epidemiology of NHPs reflects the natural carcinogenesis, there are some limitations for studying spontaneous tumors. Firstly, only individual cases were described in many studies. Secondly, most tumor cases were found accidentally during an autopsy rather than in live animals. Thus, spontaneous tumors of NHPs provide us with clues for establishing cancer animal models (Huang & Cheng, 2002).

2 Experimental tumors in NHPs

Due to the low incidence of spontaneous tumors, experimental tumor models of NHPs are necessary for human cancer research. It is well known that tumors are initiated by environmental and genetic factors. Approximately 85% of malignant neoplasms are related to chemical, biological and physical environmental factors and chemical, biological and physical carcinogens have been used to induce tumors in NHPs. Several tumor models were established by utilizing combinations of different carcinogens. NHPs can be divided into three groups: anthropoids, prosimians and tree shrews. Carcinogenesis studies have been performed on different species of NHPs from these groups including monkeys (Pfeiffer & Allen, 1948) and tree shrews (Adamson et al, 1970).

2.1 Carcinogenesis studies in anthropoids

Anthropoids, particularly monkeys, have been used to develop cancer models. Monkeys primarily consist of old world monkeys and new world monkeys. Old world monkeys, such as baboons and macaques, inhabit Asia and Africa. New world monkeys are distributed in tropical forests of southern Mexico and Central and South America. Most of them are fairly small in size and are exclusive tree dwellers.

2.1.1 Chemical carcinogens induce different types of cancers

Many different types of human cancers are caused and promoted by chemical carcinogens in food, water and air. Chemical carcinogens can be administrated to NHPs to create a model for human cancer. A long-term study of chemical-induced tumors in macaques began in 1961 by the NCI, USA (Thorgeirsson et al, 1994; Schoeffner & Thorgeirsson, 2000; Takayama et al, 2008).

Three species of NHPs, the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), and African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) were tested. A large number of substances, including a variety of food additives, food components, environmental contaminants, N-nitroso compounds, "classical" rodent carcinogens, anti-neoplastic agents, and immunosuppressive agents were evaluated for any long-term carcinogenic effects.

The fungal food contaminants, aflatoxin B1 (AFB1) (Adamson et al, 1973) and sterigmatocystin (SMT) (Thorgeirsson et al, 1994), were found to be potent hepatocarcinogens. Noticeably, AFB1 did not induce the *p53* gene mutation in macaques although *p53* is frequently mutated in human HCC from southern Africa and Qidong in China (Fujimoto et al, 1992). This suggests that the *p53* mutation in humans may be induced by carcinogens other than AFB1. AFB1 also induced adenocarcinomas of the pancreas, osteosarcomas and other tumors (Adamson et al, 1976). Three of four nitrosamines, particularly diethylnitrosamine (DENA), induced HCC (Adamson, 1989; Lapis et al, 1995). Cycasin or its aglycone, methylazoxymethanol (MAM) acetate, induced a variety of tumors, primarily hepatocellular and renal cell carcinomas (Sieber et al, 1980). 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), which is a heterocyclic amines isolated from broiled, fried or barbecued meat and fish, was found to be one of the most potent hepatocarcinogens, inducing malignant liver tumors in 65% of animals over a seven year period of exposure (Adamson et al, 1990; Thorgeirsson et al, 1994). N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) was demonstrated to be the only carcinogen persistently inducing tumors in the digestive tract, mostly squamous cell carcinomas of the esophagus (Adamson et al, 1977). Procarbazine, an anti-neoplastic agent, caused acute nonlymphocytic leukemia (Sieber et al, 1978). Several other anti-neoplastic agents, including cyclophosphamide, adriamycin, melphalan and azathioprine also induced a few tumors (Schoeffner & Thorgeirsson, 2000).

Surprisingly, none of the rodent hepatocellular carcinogens tested consistently induced HCC in rhesus and cynomolgus monkeys. This suggests that NHP cancer models may provide different information than rodents models in the study of human cancers. Similarly, dimethylbenzanthracene (DMBA), a strong rodent breast carcinogen, did not induce mammary cancers in eight female *Macaca arctoides* monkeys during a four year observation period (Lillie et al, 2004). Neither cyclamate (Takayama et al, 2000) nor saccharin (Takayama et al, 1998), which had been used as food additives and induced tumors in rats, showed any evidence of carcinogenic effects. The tumorigenic potential of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), which has been extensively used as a pesticide, was also negligible after dosing for 15–22 years (Takayama et al, 1999).

Other chemicals have been tested in NHPs in addition to those tested in the NCI study. Rhesus macaques treated with DMBA combined with UV light, dodecylbenzene (DDB), or both applied to the skin developed dermal melanosis, papillomas, basal cell tumors and mesodermal sarcomas (Palotay et al, 1976). Ohgaki et al (1986) reported that gastric carcinomas in the pyloric region were developed in five monkeys (*Macaca mulatta* and *Macaca irus*) after adding N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) to their drinking water. Similar results were obtained with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in cynomolgus monkeys (Sharashidze et al, 1989). In conclusion, numerous chemical agents can efficiently induce a variety of cancers in NHPs (Tab. 1).

2.1.2 Hormones and breast cancers

Hormone levels are well known to regulate the occurrence of breast cancer in women, making this an important focus of cancer research using animal models. The mammary epithelial cells of postmenopausal macaques are shown to express estrogen receptors (ERs) (Isaksson et al, 2002) and progesterone receptors (PRs) (Isaksson et al, 2003). Spontaneous breast tumors in macaques showed selective loss of sex steroid receptors and over-expression of the HER2 protein (Wood et al, 2006). Due to these findings, many attempts have been made to establish a breast cancer model with macaques. An early study showed that high doses of estrogen failed to induce breast neoplasm (Geschickter & Hartman, 1959). In the 1960s, a long-term study in adult monkeys sponsored by the FDA, USA assessed the risk of high doses of oral contraceptives in juvenile. A total of 213 treated and 16 control monkeys were used to evaluate the effects of a variety of synthetic oral contraceptive steroids, including synthetic estrogen mestranol, progestogens ethynerone, chloroethyl norgestrel, and anagestone acetate, on the mammary gland over a 10 year period (Drill et al, 1974; Geil & Lamar, 1977; Drill & Golway, 1978; Fitzgerald et al, 1982; Tavassoli

Tab. 1 Summary of experimental cancer models in NHPs

Species	Carcinogens	Cancer types	References
Macaca spp.	AFB1	HCC, osteosarcomas.	Adamson, 1973; Adamson, 1976
	DENA	HCC	Adamson, 1989; Lapis, 1995
	Cycasin or MAM	HCC, renal cell carcinomas	Sieber, 1980
	IQ	Malignant liver tumors	Adamson, 1990; Thorgeirsson, 1994
	MNU	Esophageal squamous cell carcinomas	Adamson, 1977
	Procarbazine	Nonlymphocytic leukemia	Sieber, 1978
	ENNG	Gastric carcinomas	Ohgaki, 1986
	HVS C488	Pleomorphic peripheral T-cell lymphomas	Knappe, 2000
Macaca mulatta	DMBA & UV, (or DDB)	Dermal melanosis, papillomas, basal cell tumors, and mesodermal sarcomas	Palotay, 1976
	Ethynerone, Mestranol, Anagestone acetate, Chloroethynyl norgestrel	Mammary carcinomas	Drill, 1974; Geil, 1977; Drill, 1978; Fitzgerald, 1982; Tavassoli, 1988
	H. pylori & ENNG	Gastric carcinomas	Liu, 2009
	SIV	AIDS-associated lymphomas	Murphey-Corb, 1986
	Radiation	Brain tumors	Wakisaka, 1982
	55-MeV protons	Malignant brain tumors	Wood, 1991
Macaca fascicularis	SIVsm	AIDS-associated lymphomas	Feichtinger, 1990; Putkonen, 1992
	MNNG	Stomach cancers	Sharashidze, 1989
Saguinus oedipus	HVS C488	Acute peripheral T-cell lymphomas	Knappe, 1998;
	HVA	Acute T-cell lymphomas	Hunt, 1972
	EBV	Malignant lymphomas	Shope, 1973a; Cleary, 1985; Epstein, 1985
Callithrix jacchus	HVS C488	Multicentric lymphomas	Duboise, 1998
Galagos spp.	DENA	Nasal mucoepidermoid carcinoma	Thorgeirsson, 1994
Galago crossicaudatus	DMBA & DDB	Papillomas, basosquamous cell epithelioma	Palotay, 1976
Perodicticus potto	DMBA & DDB	Dermal neoplasm	Palotay, 1976
Tupaia belangeri chinenesis	HBV, AFB1	HCC	Yan, 1996; Li, 2004; Li, 2008
Tupaia glis	AFB1	HCC	Reddy, 1976;
	DHPN	Pulmonary adenomas, squamous cell epithelioma	Rao, 1980

et al, 1988). Seventeen mammary carcinomas were identified primarily in the groups treated with high-dose estrogen-progestogen combinations (mestranol+ethynerone, mestranol+anagestone acetate, and mestranol+ chloroethynyl norgestrel) and three were observed in the group treated with ethynerone alone (Tavassoli et al, 1988). Consistently, estradiol and synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (MPA) resulted in significantly greater breast epithelial proliferation in ovariectomized adult female cynomolgus macaques (Wood et al, 2007). However, Valerio (1989) summarized data from 17 contraceptive steroid studies in macaques and found that *in situ* ductal carcinomas and invasive breast carcinomas were identified in only 4/264 controls (1.5%) and 13/733 treated animals (1.7%). These results imply that hormones alone are not strong carcinogens in macaques.

2.1.3 Infection-associated cancers

Cancer is not an infectious disease, but some infectious agents can induce cancer. The World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer estimated that the total number of infection-associated cancers was approximately 1.9 million in 2002, accounting for 17.8% of human cancers. The principle causes included hepatitis B and C viruses, human papilloma viruses (HPVs), human immunodeficiency virus (HIV), T-lymphotropic viruses, Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus 8, and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Parkin, 2006).

2.1.3.1 *Helicobacter pylori* and gastric cancer

Gastric cancer is the fourth most common cancer worldwide (almost 10% of new cancers) and the second leading cause of cancer mortality. *H. pylori* is well known to cause chronic infection in the human gastric

mucosa, to be a major cause of peptic ulcer disease, and a principal risk factor for gastric cancer (Parsonnet et al, 1991). Several rodent models such as the mouse, rat and Mongolian gerbil, have been used extensively to study *H. pylori*-induced diseases. The Mongolian gerbil was found to be the only species in which gastric cancer could be induced by *H. pylori* infection (Ogura et al, 2000). *H. pylori* has been shown to infect several NHPs including chimpanzees (*Pan troglodytes*) (Hazell et al, 1992), rhesus monkeys (Euler et al, 1990), cynomolgus monkeys (Euler et al, 1990) and Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) (Shuto et al, 1993). The infection of *H. pylori* caused atrophic gastritis and p53 mutations in the Japanese monkey model (Oda et al, 2002); however, the Japanese monkey model did not develop gastric carcinoma after five years after the first infection. Liu et al reported that gastric intraglandular neoplasia were induced in three rhesus macaques infected with *H. pylori* and that received the ENNG carcinogen, which is similar to the nitrosamines found in pickled vegetables, while no gastric carcinomas were induced by *H. pylori* and ENNG alone (Liu et al, 2009). Thus, *H. pylori* infection is a potential risk factor for inducing gastric neoplasia.

2.1.3.2 Virus-associated cancers

The vast majority of human and animal viruses do not cause cancer after infection. However, some viruses do initiate cancer in a small percentage of cases and are appropriately named tumor viruses. Tumor viruses induce tumors potentially by causing genetic changes in host cells. A number of these viruses have been associated with specific cancers in humans such as HPV and cervical cancer, HBV and liver cancer, EBV and nasopharyngeal cancer and lymphoma, and HIV and lymphoma (Ma & Chan, 2009).

1) Simian herpesvirus and T-cell lymphomas

Both herpesvirus saimiri (HVS) and herpesvirus ateles (HVA) belong to the simian herpesvirus group, and are known to cause no disease or only minor disease in their natural new world monkey hosts squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) and spider monkeys (*Ateles paniscus*) respectively. However, HVS and HVA can induce lymphomas or lymphoblastic leukemias in other monkey species. HVS caused acute peripheral T-cell lymphomas in other new world primates such as tamarins (*Saguinus* spp.), common marmosets (*Callithrix jacchus*), and owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) (Meléndez et al, 1969; Fleckenstein et al, 1978). These monkey species are presumably not infected by HVS in the wild. Tamarins are observed to be susceptible to all subgroups (A, B, and C) of HVS. Wild type HVS (type C) caused acute peripheral T-cell lymphomas within only a few weeks in common marmosets and in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) (Duboise et al, 1998; Knappe et al, 1998). HVS C488 (a mutant species) even induced pleomorphic peripheral T-cell lymphomas in old world monkeys (Knappe et al, 2000). Similar to HVS, HVA also induced acute T-cell lymphomas in cotton-top tamarins (Hunt et al, 1972).

2) Epstein-Barr virus and lymphomas

EBV is one of the five human herpesviruses, human herpesvirus 4 (HHV-4). EBV is known to cause several lymphoproliferative disorders and cancers, particularly Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, and central nervous system lymphomas associated with HIV (Long et al, 2010). The cotton-top tamarin is the only species in which experimental EBV infection is observed to regularly cause malignant lymphomas. Shope et al (1973a) inoculated cotton-top tamarins with EBV and found that one of the four monkeys that received autologous cells transformed *in vitro* by EBV developed lymphoma in mesenteric lymph nodes and three of the four monkeys inoculated with cell-free EBV developed lymphoma. Cleary et al (1985) inoculated cotton-top tamarins with EBV and observed multiple tumors within 14 to 21 days. Additionally, each lymphoma from the same animal induced by EBV arose from different B-cell clones. This resembles EBV-associated human lymphomas that occur with organ transplants. Importantly, tamarins vaccinated with virus-determined membrane antigen gp340 were effectively protected from tumor induction by a massive challenge dose of EBV (Epstein et al, 1985). However, EBV cannot induce tumors in adult squirrel monkeys (Shope et al, 1973b) and gibbons (*Hylobates lar*) (Werner et al, 1972).

3) Simian AIDS-associated lymphomas

The frequency of lymphomas in AIDS patients is approximately 60 to 100 times that of the general population (Spittle, 1998). Despite the fact that Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) reduces the incidence of opportunistic infections and prolongs the survival time for HIV-infected patients, the incidence of AIDS-associated lymphomas (AAL) is not reduced. It has been reported that macaques infected with Simian immunodeficiency virus (SIV) developed malignant lymphomas and an AIDS-like syndrome (Feichtinger et al, 1990). Since 1984, complete necropsy examinations

have been performed on more than 1,000 SIV-infected rhesus macaques at the Tulane Regional Primate Research Center and lymphomas have been detected in 38 animals (Murphey-Corb et al, 1986). The low incidence of AAL in SIV-infected rhesus macaques (~4%) is similar to that in AIDS patients. Several approaches, such as using cynomolgus macaques, administering cytokines, using less pathogenic SIV strains, or combining SIV with various herpesviruses have been proposed to increase the incidence of lymphomas in macaques to establish models using less animals (Baskin et al, 2001). The incidence of simian AAL in cynomolgus macaques is eight-fold higher than that in rhesus macaques. Malignant lymphomas were observed in nine of 24 (38%) SIVsm-infected cynomolgus monkeys and all tumors were high-grade B-cell lymphoblastic or pleomorphic lymphomas with extranodal and disseminated growth (Feichtinger et al, 1990). Similar results were observed in another independent study (Putkonen et al, 1992). Thus, SIV-infected macaques (both rhesus and cynomolgus) demonstrated similar features of AAL, including B-cell origin, extranodal anatomic distribution, the absence of SIV in tumor cells and the presence of rhesus lymphocryptovirus (Habis et al, 1999). Interestingly, SIV-infected macaques that had lymphomas with large nuclei survived longer than those that had lymphomas with small nuclei (Habis et al, 1999). This phenomenon was also observed in patients with Burkitt's-like lymphomas. Taken together, SIV-infected monkeys are appropriate animal models to study human AAL.

2.1.4 Radiation-induced cancers

It is well established that radiation can induce cancer in humans. An early study in NHPs showed that radiation induced brain tumors in rhesus monkeys (Wakisaka et al, 1982). Consistently, rhesus monkeys exposed to 55-MeV protons displayed a high incidence of malignant brain tumors with latent periods ranging from 13 months to 20 years (Wood, 1991).

2.2 Carcinogenesis studies in prosimians

Prosimians have few similarities with humans. They are small in size, nocturnal and only found in the old world. To date, only two prosimian species (Galagos and Pottos) have been used in cancer research. When Galagos were administered DENA, a potent hepatocarcinogen in cynomolgus, rhesus, and African green monkeys intraperitoneally the animals developed primarily mucoepidermoid carcinomas of the nasal cavity (Thorgeirsson et al, 1994). In another study, galagos (*Galago crossicaudatus*) were treated with DMBA and DDB biweekly for four years and papillomas, basal cell tumors and basosquamous cell epidermal tumors with satellite lipomas were observed within eight years (Palotay et al, 1976). When DMBA and DDB were applied to the skin of pottos (*Perodicticus potto*) neoplasms were observed in 17 of the 19 primates that lived longer than nine weeks (Palotay et al, 1976).

2.3 Carcinogenesis studies in tree shrews

Tree shrews (*Tupaia* spp.) are non-rodent and primate-like animals native to the tropical forests of Southeast Asia. Previously, tree shrews were grouped with prosimians because of certain internal similarities (brain anatomy for example) but now they have been assigned a separate order, scandentia, based on recent molecular phylogenetic studies. There are 20 species in five genera. All tree shrews share some common characteristics such as a relatively small body mass, generally omnivorous diet, and non-prehensile hands and feet (Martin, 1990). Since 1966 when the first spontaneous case of breast cancer was observed in tree shrews (Elliot et al, 1966) further cases of other spontaneous cancers have been described such as HCC (Hofmann et al, 1981), epidermoid carcinoma, and lymphoma (Brack, 1998). Hence, tree shrews may also be useful experimental animal models for carcinogenesis studies.

2.3.1 Hepatocellular carcinomas

HCC is a major cause of cancer deaths worldwide and accounts for ~6% of all human cancers. The development of HCC is considered to be caused by the HBV infection and chemical carcinogens such as AFB1. During the 1970s, Reddy et al (1976) successfully induced HCC in tree shrews (*Tupaia glis*) by administering AFB1. Yan et al (1996) found that tree shrews (*Tupaia belangeri chinenesis*) could be infected with human HBV. Further investigation revealed that HBV in combination with AFB1 significantly increased the incidence of HCC (52.9%) compared to HBV alone (11.11%) or AFB1 alone (12.50%). Oltipraz treatment protected tree shrews from AFB1-induced liver cancer in a manner similar to that observed in rodents and humans (Li et al, 2000). The tree shrew p53 sequence shares 91.7% (nucleotide) and 93.4% (amino acid) homology with the human p53 sequence (Park et al, 2000). Park et al (2000) detected mutations in the *p53* gene in tree shrews exposed to AFB1 and/or HBV (Park et al, 2000).

In addition to the mutation of p53, AFB1 and HBV up-regulated the expression of the *Ras* gene in tree shrews before HCC development (Su et al, 2004). To understand the mechanism by which AFB1 induced HCC, Li et al (2004) examined gene expression profiles during AFB1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrews and identified a set of genes that were up- or down-regulated in HCC. Following that, a group of candidate proteins that were differentially expressed in tree shrew HCC were obtained by proteome analysis (Li et al, 2008). The peroxiredoxin (Prx) II protein was found to be overexpressed in both tree shrew and human HCC. When Prx II expression was inhibited by siRNAs in human Hep3B cells, cell proliferation and survival decreased significantly (Li et al, 2008). These findings suggest that the tree shrew is a suitable animal model for studying the mechanisms of human HCC.

2.3.2 Pulmonary adenomas

Lung cancer is the leading cause of human cancer deaths worldwide. Therefore, the task of finding an effective NHP model to study lung cancer is an important objective in cancer research. In one study with NHPs, the carcinogenic effects of 2, 2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine (DHPN) on tree shrews (*Tupaia glis*) was examined. DHPN was subcutaneously administered to tree shrews at a dose of 250 mg/kg of body weight once a week for 80 weeks. Eight of the nine males (89%) and 11 of the 14 females (78%) that received DHPN developed pulmonary adenomas between weeks 65 and 102 (Rao & Reddy, 1980). Additionally, 9% of the DHPN-treated tree shrews developed squamous cell carcinomas of the skin and HCC. Taken together, tree shrew may be a suitable animal model for lung cancer research.

3 NHPs for cancer genetics studies, therapies and prevention

NHPs have been used in cancer genetics studies in the past. For instance, the evolution of tumor suppressor genes such as *BRCA1* (Pavlicek et al, 2004; Puente et al, 2006) and *p53* (Contente et al, 2003) in NHPs has been previously reported. To identify potential human cancer-related genes, comparative genomic hybridization (CGH) has been used to generate cytogenetic profiles of malignant gliomas in four monkey tumors (Jaikumar et al, 2007). In 2005, the chimpanzee genome was sequenced (Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium et al, 2005) and two years later, the rhesus macaque genome was sequenced (Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium et al, 2007). The sequencing of more NHP genomes will further accelerate comparative cancer genetic studies in NHPs and humans.

In addition to the study of cancer-related genes, NHP models are ideal for studying drugs for cancer therapies and chemoprevention because of their genetic similarity with humans. NHPs have been widely used to evaluate the safety and pharmacokinetics of anti-tumor drugs and vaccines (Parker et al, 1995; Kim et al, 2001; Hassan et al, 2007; Kapetanovic et al 2010; Morera et al, 2010). The rhesus monkey in particular is suggested to be an excellent candidate for a NHP model for ovarian cancer chemoprevention (Brewer et al, 2001a, b). Using cultured rhesus ovarian surface epithelium cells, Wright et al (2005) demonstrated that high-dose estrogen and clinical selective ER modulators induced growth arrest *in vitro*. Rodriguez et al (1998) showed that oral contraceptive progestin induced apoptosis in the ovarian epithelium. Additionally, an agonist of toll-like receptor 5 has been reported to protect rhesus monkeys from lethal irradiation routinely used to treat cancer patients (Burdelya et al, 2008). More recently, caloric restriction has been demonstrated to delay the onset of age-associated diseases, including cancer, in rhesus monkeys (Colman et al, 2009).

4 Conclusions and perspectives

NHPs share numerous similarities with humans and have been widely used to study human diseases such as AIDS, hepatitis and neurodegenerative diseases. However, NHPs have not been widely used for cancer research because of the low incidence of spontaneous tumors, long latency, slow propagation and high costs. Different chemical, biological (including hormones, bacteria, and viruses), and physical carcinogens have been used to induce a variety of tumors in different NHPs, including macaques and tree shrews. These NHP cancer models provide valuable knowledge for human cancer prevention and treatment due to their similarity to human cancers.

More NHP cancer models are required to better understand mechanisms of human carcinogenesis and to design more effective prevention and treatment options for cancer patients. An ideal animal model for cancer research should faithfully reflect various aspects of the human disease such as the etiology, pathology, genetics

and therapy. Additionally, tumors should be expected to develop with a high incidence and a relatively short latency. NHPs have the potential to grow as tools for human cancer research with the development of technology. For example, NHP transgenic techniques have recently been established (Niu et al, 2010). Finally, as primate-like animals, tree shrews which are smaller in size, propagate rapidly and cost comparatively less than larger NHPs and may be a superior model for cancer research and help overcome the disadvantages of using rodents and other NHPs. We are currently trying to establish tree shrew cancer models by using chemical and biological carcinogens. It is our belief that NHPs will play a more significant role in future cancer research.

References:

Adamson RH. 1989. Induction of hepatocellular carcinoma in nonhuman primates by chemical carcinogens [J]. *Cancer Detect Prev*, **14**(2): 215-219.

Adamson RH, Cooper RW, O'Gara RW. 1970. Carcinogen-induced tumors in primitive primates [J]. *J Natl Cancer Inst*, **45**(3): 555-559.

Adamson RH, Correa P, Dalgard DW. 1973. Occurrence of a primary liver carcinoma in a Rhesus monkey fed aflatoxin B1 [J]. *J Natl Cancer Inst*, **50**(2): 549-553.

Adamson RH, Correa P, Sieber SM, McIntire KR, Dalgard DW. 1976. Carcinogenicity of aflatoxin B1 in rhesus monkeys: two additional cases of primary liver cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, **57**(1): 67-78.

Adamson RH, Krollkowski FJ, Correa P, Sieber SM and Dalgard DW. 1977. Carcinogenecity of 1-methyl-1-nitrosourea in nonhuman primates [J]. *J Natl Cancer Inst*, **59**: 415-422.

Adamson RH, Thorgeirsson UP, Snyderwine EG, Thorgeirsson SS, Reeves J, Dalgard DW, Takayama S, Sugimura T. 1990. Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques [J]. *Jpn J Cancer Res*, **81**(1): 10-14.

Bailey J. 2009. An examination of chimpanzee use in human cancer research [J]. *Altern Lab Anim,* **37**(4): 399-416.

Baskin GB, Cremer KJ, Levy LS. 2001. Comparative pathobiology of HIV- and SIV-associated lymphoma [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses,* **17**(8): 745-751.

Beniashvili DS. 1989. An overview of the world literature on spontaneous tumors in nonhuman primates [J]. *J Med Primatol*, **18**(6): 423-437.

Brack M. 1998. Spontaneous tumours in tree shrews (Tupaia belangeri): population studies [J]. *J Comp Pathol*, **118**(4): 301-316.

Brewer M, Baze W, Hill L, Utzinger U, Wharton JT, Follen M, Khan-Dawood F, Satterfield W. 2001a. Rhesus macaque model for ovarian cancer chemoprevention [J]. *Comp Med,* **51**(5): 424-429.

Brewer M, Utzinger U, Satterfield W, Hill L, Gershenson D, Bast R, Wharton JT, Richards-Kortum R, Follen M. 2001b. Biomarker modulation in a nonhuman rhesus primate model for ovarian cancer chemoprevention [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**(8): 889-893.

Bunton TE, Bacmeister CX. 1989. Diverticulosis and colonic leiomyosarcoma in an aged rhesus macaque [J]. *Vet Pathol*, **26**(4): 351-352.

Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, Didonato JA, Feinstein E, Gudkov AV. 2008. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models [J]. *Science,* **320**(5873): 226-230.

Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome [J]. *Nature,* **437**(7055): 69-87.

Cianciolo RE, Hubbard GB. 2005. A review of spontaneous neoplasia in baboons (*Papio* spp.) [J]. *J Med Primatol*, **34**(2): 51-66.

Cleary ML, Epstein MA, Finerty S, Dorfman RF, Bornkamm GW, Kirkwood JK, Morgan AJ, Sklar J. 1985. Individual tumors of multifocal EB virus-induced malignant lymphomas in tamarins arise from different B-cell clones [J]. *Science*, **228**(4700): 722-724.

Coggins CR. 2007. An updated review of inhalation studies with cigarette smoke in laboratory animals [J]. *Int J Toxicol*, **26**(4): 331-338.

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys [J]. *Science,* **325**(5937): 201-204.

Contente A, Zischler H, Einspanier A, Dobbelstein M. 2003. A promoter that acquired p53 responsiveness during primate evolution [J]. *Cancer Res,* **63**(8): 1756-1758.

Drill VA, Golway PL. 1978. Effect of ethynodiol diacetate with ethinyl estradiol on the mammary glands of rhesus monkeys: a preliminary report [J]. *J Natl Cancer Inst*, **60**(5): 1169-1170.

Drill VA, Martin DP, Hart ER, McConnell RG. 1974. Effect of oral contraceptives on the mammary glands of Rhesus monkeys: a preliminary report [J]. *J Natl Cancer Inst*, **52**(5): 1655-1657.

Duboise M, Guo J, Czajak S, Lee H, Veazey R, Desrosiers RC, Jung JU. 1998. A role for herpesvirus saimiri orf14 in transformation and persistent infection [J]. *J Virol*, **72**(8): 6770-6776.

Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. 1966. Breast cancer in a tree shrew (Tupaia glis) [J]. *Nature*, **211**(5053): 1105.

Epstein MA, Morgan AJ, Finerty S, Randle BJ, Kirkwood JK. 1985. Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine [J]. *Nature,* **318**(6043): 287-289.

Euler AR, Zurenko GE, Moe JB, Ulrich RG, Yagi Y. 1990. Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease [J]. *J Clin Microbiol*, **28**(10): 2285-2290.

Feichtinger H, Putkonen P, Parravicini C, Li SL, Kaaya EE, Böttiger D, Biberfeld G, Biberfeld P. 1990. Malignant lymphomas in cynomolgus monkeys infected with simian immunodeficiency virus [J]. *Am J Pathol*, **137**(6): 1311-1315.

Fitzgerald J, de la Iglesia F, Goldenthal EI. 1982. Ten-year oral toxicity study with Norlestrin in rhesus monkeys [J]. *J Toxicol Environ Health*, **10**(6): 879-896.

Fleckenstein B, Daniel MD, Hunt RD, Werner J, Falk LA, Mulder C. 1978. Tumour induction with DNA of oncogenic primate herpesviruses [J]. *Nature*, **274**(5666): 57-59.

Fujimoto Y, Hampton LL, Luo LD, Wirth PJ, Thorgeirsson SS. 1992. Low frequency of p53 gene mutation in tumors induced by aflatoxin B1 in nonhuman primates [J]. *Cancer Res*, **52**(4): 1044-1046.

Geil RG, Lamar JK. 1977. FDA studies of estrogen, progestogens, and estrogen/progestogen combinations in the dog and monkey [J]. *J Toxicol Environ Health*, **3**(1-2): 179-193.

Geschickter CF, Hartman CG. 1959. Mammary response to prolonged estrogenic stimulation in the monkey [J]. *Cancer*, **12**(4): 767-781.

Habis A, Baskin GB, Murphey-Corb M, Levy LS. 1999. Simian AIDS-associated lymphoma in rhesus and cynomolgus monkeys recapitulates the primary pathobiological features of AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **15**(15): 1389-1398.

Hassan R, Ebel W, Routhier EL, Patel R, Kline JB, Zhang J, Chao Q, Jacob S, Turchin H, Gibbs L, Phillips MD, Mudali S, Iacobuzio-Donahue C, Jaffee EM, Moreno M, Pastan I, Sass PM, Nicolaides NC, Grasso L. 2007. Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin [J]. *Cancer Immun,* **7**: 20.

Hazell SL, Eichberg JW, Lee DR, Alpert L, Evans DG, Evans DJ Jr, Graham DY. 1992. Selection of the chimpanzee over the baboon as a model for *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gastroenterology*, **103**(3): 848-854.

Hofmann W, Möller P, Schwaier A, Flügel RM, Zöller L, Darai G. 1981. Malignant tumours in *Tupaia* (tree shrew). *J Med Primatol*, **10**(2-3): 155-163.

Huang R, Cheng SJ. 2002. Review of spontaneous tumors in non-human primates [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sini,* **10**: 123-128. (in Chinese)

Hunt RD, Meléndez LV, García FG, Trum BF. 1972. Pathologic features of Herpesvirus ateles lymphoma in cotton-topped marmosets (*Saguinus oedipus*) [J]. *J Natl Cancer Inst*, **49**(6): 1631-1639.

Isaksson E, Wang H, Sahlin L, von Schoultz B, Cline JM, von Schoultz E. 2003. Effects of long-term HRT and tamoxifen on the expression of progesterone receptors A and B in breast tissue from surgically postmenopausal cynomolgus macaques [J]. *Breast Cancer Res Treat*, **79**(2): 233-239.

Isaksson E, Wang H, Sahlin L, von Schoultz B, Masironi B, von Schoultz E, Cline JM. 2002. Expression of estrogen receptors (alpha, beta) and insulin-like growth factor-I in breast tissue from surgically postmenopausal cynomolgus macaques after long-term treatment with HRT and tamoxifen [J]. *Breast*, **11**(4): 295-300.

Jaikumar S, Zhuang Z, Mannan P, Vortmeyer AO, Furuta M, Dickerman R, Bedanova J, Lonser RR, Walbridge S, Weil RJ, Lobanenkov VV, Oldfield EH, Pack SD. 2007. Interspecies comparative genomic hybridization (I-CGH): a new twist to study animal tumor models [J]. *Cell Cycle,* **6**(7): 836-842.

Jayo MJ, Jayo JM, Jerome CP, Krugner-Higby L, Reynolds GD. 1988. Maxillo-orbital lymphoma (Burkitt's-type) in an infant *Macaca fascicularis* [J]. *Lab Anim Sci*, **38**(6): 722-726.

Kapetanovic IM, Muzzio M, Hu SC, Crowell JA, Rajewski RA, Haslam JL, Jong L, McCormick DL. 2010. Pharmacokinetics and enhanced bioavailability of candidate cancer preventative agent, SR13668 in dogs and monkeys [J]. *Cancer Chemother Pharmacol,* **65**(6): 1109-1116.

Kim JJ, Yang JS, Dang K, Manson KH, Weiner DB. 2001. Engineering enhancement of immune responses to DNA-based vaccines in a prostate cancer model in rhesus macaques through the use of cytokine gene adjuvants [J]. *Clin Cancer Res,* **7**: 882s-889s.

Knappe A, Feldmann G, Dittmer U, Meinl E, Nisslein T, Wittmann S, Mätz-Rensing K, Kirchner T, Bodemer W, Fickenscher H. 2000. Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion [J]. *Blood,* **95**(10): 3256-3261.

Knappe A, Thurau M, Niphuis H, Hiller C, Wittmann S, Kuhn EM, Rosenwirth B, Fleckenstein B, Heeney J, Fickenscher H. 1998. T-cell lymphoma caused by herpesvirus saimiri C488 independently of ie14/vsag, a viral gene with superantigen homology [J]. *J Virol*, **72**(4): 3469-3471.

Lapis K, Zalatnai A, Timár F, Thorgeirsson UP. 1995. Quantitative evaluation of lysozyme- and CD68-positive Kupffer cells in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in monkeys [J]. *Carcinogenesis,* **16**(12): 3083-3085.

Li Y, Qin X, Cui J, Dai Z, Kang X, Yue H, Zhang Y, Su J, Cao J, Ou C, Yang C, Duan X, Yue H, Liu Y. 2008. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (Tupaia belangeri chinensis) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II [J]. *Proteomics,* **8**(7): 1490-1501.

Li Y, Su J, Qin L, Egner PA, Wang J, Groopman JD, Kensler TW, Roebuck BD. 2000. Reduction of aflatoxin B(1) adduct biomarkers by oltipraz in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Cancer Lett*, **154**(1): 79-83.

Li Y, Wan DF, Su JJ, Cao J, Ou C, Qiu XK, Ban KC, Yang C, Qin LL, Luo D, Yue HF, Zhang LS, Gu JR. 2004. Differential expression of genes during aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in tree shrews [J]. *World J Gastroenterol,* **10**(4): 497-504.

Lillie MA, Ambrus CM, Pickren JW, Akhter S, Islam A, Ambrus JL. 2004. Breast cancer in intraductal carcinogen-treated non-human primates [J]. *J Med,* **35**(1-6): 271-275.

Liu H, Merrell DS, Semino-Mora C, Goldman M, Rahman A, Mog S, Dubois A. 2009. Diet synergistically affects *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis in nonhuman primates [J]. *Gastroenterology*, **137**(4): 1367-1379.

Long HM, Parsonage G, Fox CP, Lee SP. 2010. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated malignancies [J]. *Drug News Perspect*, **23**(4): 221-228.

Ma BB, Chan AT. 2009. Infection and cancer: biology, therapeutics and prevention [J]. *Future Oncol*, **5**(2): 149-151.

Martin, R.D. 1990. Primate Origins and Evolution: A Phylogenetic Reconstruction[M]. Princeton University Press: Princeton, N.J.

Meléndez LV, Hunt RD, Daniel MD, García FG, Fraser CE. 1969. Herpesvirus saimiri. II. Experimentally induced malignant lymphoma in primates [J]. *Lab Anim Care*, **19**(3): 378-386.

Morera Y, Bequet-Romero M, Ayala M, Velazco JC, Pérez PP, Alba JS, Ancizar J, Rodríguez M, Cosme K, Gavilondo JV. 2010. Immunogenicity and some safety features of a VEGF-based cancer therapeutic vaccine in rats, rabbits and non-human primates [J]. *Vaccine,* **28**(19): 3453-3461.

Murphey-Corb M, Martin LN, Rangan SR, Baskin GB, Gormus BJ, Wolf RH, Andes WA, West M, Montelaro RC. 1986. Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys [J]. *Nature,* **321**(6068): 435-437.

Niu Y, Yu Y, Bernat A, Yang S, He X, Guo X, Chen D, Chen Y, Ji S, Si W, Lv Y, Tan T, Wei Q, Wang H, Shi L, Guan J, Zhu X, Afanassieff M, Savatier P, Zhang K, Zhou Q, Ji W. 2010. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(41): 17663-17667.

Oda T, Murakami K, Nishizono A, Kodama M, Nasu M, Fujioka T. 2002. Long-term *Helicobacter pylori* infection in Japanese monkeys induces atrophic gastritis and accumulation of mutations in the p53 tumor suppressor gene [J]. *Helicobacter*, **7**(3): 143-151.

Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. 2000. Virulence factors of

Helicobacter pylori responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil [J]. *J Exp Med*, **192**(11): 1601-1610.

Ohgaki H, Hasegawa H, Kusama K, Morino K, Matsukura N, Sato S, Maruyama K, Sugimura T. 1986. Induction of gastric carcinomas in nonhuman primates by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. *J Natl Cancer Inst*, **77**(1): 179-186.

Palotay JL, Adachi K, Dobson RL, Pinto JS. 1976. Carcinogen-induced cutaneous neoplasms in nonhuman primates [J]. *J Natl Cancer Inst*, **57**(6): 1269-1274.

Park US, Su JJ, Ban KC, Qin L, Lee EH, Lee YI. 2000. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1 [J]. *Gene*, **251**(1): 73-80.

Parker SE, Vahlsing HL, Serfilippi LM, Franklin CL, Doh SG, Gromkowski SH, Lew D, Manthorpe M, Norman J. 1995. Cancer gene therapy using plasmid DNA: safety evaluation in rodents and non-human primates [J]. *Hum Gene Ther,* **6**(5): 575-590.

Parkin DM. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 [J]. *Int J Cancer*, **118**(12): 3030-3044.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma [J]. *N Engl J Med*, **325**(16): 1127-1131.

Pavlicek A, Noskov VN, Kouprina N, Barrett JC, Jurka J, Larionov V. 2004. Evolution of the tumor suppressor BRCA1 locus in primates: implications for cancer predisposition [J]. *Hum Mol Genet,* **13**(22): 2737-2751.

Pellegrini G, Bienvenu JG, Meehan JT, Mischler SA, Perry RW, Scott DW, Anderson WI. 2009. Cutaneous melanoma with metastasis in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) [J]. *J Med Primatol*, **38**(6): 444-447.

Pfeiffer CA, Allen E. 1948. Attempts to produce cancer in rhesus monkeys with carcinogenic hydrocarbons and estrogens [J]. *Cancer Res*, **8**(3): 97-127.

Puente XS, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Bertranpetit J, King MC, López-Otín C. 2006. Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes [J]. *BMC Genomics*, **7**: 15.

Putkonen P, Kaaya EE, Böttiger D, Li SL, Nilsson C, Biberfeld P, Biberfeld G. 1992. Clinical features and predictive markers of disease progression in cynomolgus monkeys experimentally infected with simian immunodeficiency virus [J]. *AIDS*, **6**(3): 257-263.

Rao MS, Reddy JK. 1980. Carcinogenicity of 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in the tree shrew (*Tupaia glis*): light and electron microscopic features of pulmonary adenomas [J]. *J Natl Cancer Inst*, **65**(4): 835-840.

Reddy JK, Svoboda DJ, Rao MS. 1976. Induction of liver tumors by aflatoxin B1 in the tree shrew (*Tupaia glis*), a nonhuman primate [J]. *Cancer Res*, **36**(1): 151-160.

Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium, Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, Bumgarner R, Weinstock GM, Mardis ER, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Wilson RK, Batzer MA, Bustamante CD, Eichler EE, Hahn MW, Hardison RC, Makova KD, Miller W, Milosavljevic A, Palermo RE, Siepel A, Sikela JM, Attaway T, Bell S, Bernard KE, Buhay CJ, Chandrabose MN, Dao M, Davis C, Delehaunty KD, Ding Y, Dinh HH, Dugan-Rocha S, Fulton LA, Gabisi RA, Garner TT, Godfrey J, Hawes AC, Hernandez J, Hines S, Holder M, Hume J, Jhangiani SN, Joshi V, Khan ZM, Kirkness EF, Cree A, Fowler RG, Lee S, Lewis LR, Li Z, Liu YS, Moore SM, Muzny D, Nazareth LV, Ngo DN, Okwuonu GO, Pai G, Parker D, Paul HA, Pfannkoch C, Pohl CS, Rogers YH, Ruiz SJ, Sabo A, Santibanez J, Schneider BW, Smith SM, Sodergren E, Svatek AF, Utterback TR, Vattathil S, Warren W, White CS, Chinwalla AT, Feng Y, Halpern AL, Hillier LW, Huang X, Minx P, Nelson JO, Pepin KH, Qin X, Sutton GG, Venter E, Walenz BP, Wallis JW, Worley KC, Yang SP, Jones SM, Marra MA, Rocchi M, Schein JE, Baertsch R, Clarke L, Csürös M, Glasscock J, Harris RA, Havlak P, Jackson AR, Jiang H, Liu Y, Messina DN, Shen Y, Song HX, Wylie T, Zhang L, Birney E, Han K, Konkel MK, Lee J, Smit AF, Ullmer B, Wang H, Xing J, Burhans R, Cheng Z, Karro JE, Ma J, Raney B, She X, Cox MJ, Demuth JP, Dumas LJ, Han SG, Hopkins J, Karimpour-Fard A, Kim YH, Pollack JR, Vinar T, Addo-Quaye C, Degenhardt J, Denby A, Hubisz MJ, Indap A, Kosiol C, Lahn BT, Lawson HA, Marklein A, Nielsen R, Vallender EJ, Clark AG, Ferguson B, Hernandez RD, Hirani K, Kehrer-Sawatzki H, Kolb J, Patil S, Pu LL, Ren Y, Smith DG, Wheeler DA, Schenck I, Ball EV, Chen R, Cooper DN, Giardine B, Hsu F, Kent WJ, Lesk A, Nelson DL, O'brien WE, Prüfer K, Stenson PD, Wallace JC, Ke H, Liu XM, Wang P, Xiang AP, Yang F, Barber GP, Haussler D, Karolchik D, Kern AD, Kuhn RM, Smith KE, Zwieg AS. 2007. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome [J]. *Science,* **316**(5822): 222-234.

Roberts TG Jr, Goulart BH, Squitieri L, Stallings SC, Halpern EF, Chabner BA, Gazelle GS, Finkelstein SN, Clark JW. 2004. Trends in the risks and benefits to patients with cancer participating in phase 1 clinical trials [J]. *JAMA*, **292**(17): 2130-2140.

Rodriguez GC, Walmer DK, Cline M, Krigman H, Lessey BA, Whitaker RS, Dodge R, Hughes CL. 1998. Effect of progestin on the ovarian epithelium of macaques: cancer prevention through apoptosis [J]? *J Soc Gynecol Investig,* **5**(5): 271-276.

Schoeffner DJ, Thorgeirsson UP. 2000. Susceptibility of nonhuman primates to carcinogens of human relevance [J]. *In Vivo*, **14**(1): 149-156.

Shope T, Dechairo D, Miller G. 1973a. Malignant lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **70**(9): 2487-2491.

Shope T, Miller G. 1973b. Epstein-Barr virus. Heterophile responses in squirrel monkeys inoculated with virus-transformed autologous leukocytes [J]. *J Exp Med*, **137**(1): 140-147.

Shuto R, Fujioka T, Kubota T, Nasu M. 1993. Experimental gastritis induced by *Helicobacter pylori* in Japanese monkeys [J]. *Infect Immun*, **61**(3): 933-939.

Sieber SM, Correa P, Dalgard DW, Adamson RH. 1978. Carcinogenic and other adverse effects of procarbazine in nonhuman primates [J]. *Cancer Res*, **38**(7): 2125-2134.

Sieber SM, Correa P, Dalgard DW, McIntire KR, Adamson RH. 1980. Carcinogenicity and hepatotoxicity of cycasin and its aglycone methylazoxymethanol acetate in nonhuman primates [J]. *J Natl Cancer Inst*, **65**(1): 177-189.

Sharashidze LK, Beniashvili DSh, Sherenesheva NI, Turkia NG. 1989. Induction of gastric cancer in monkeys by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) [J]. *Neoplasma,* **36**(2): 129-133.

Spittle MF. 1998. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders [J]. *Lancet*, **352**(9131): 907.

Su JJ, Ban KC, Li Y, Qin LL, Wang HY, Yang C, Ou C, Duan XX, Lee YL, Yang RQ. 2004. Alteration of p53 and p21 during hepatocarcinogenesis in tree shrews [J]. *World J Gastroenterol*, **10**(24): 3559-3563.

Starost MF. 2009. Adenomyofibroma of the fimbria in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) [J]. *J Vet Diagn Invest*, **21**(6): 892-894.

Takayama S, Renwick AG, Johansson SL, Thorgeirsson UP, Tsutsumi M, Dalgard DW, Sieber SM. 2000. Long-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates [J]. *Toxicol Sci*, **53**(1): 33-39.

Takayama S, Sieber SM, Adamson RH, Thorgeirsson UP, Dalgard DW, Arnold LL, Cano M, Eklund S, Cohen SM. 1998. Long-term feeding of sodium saccharin to nonhuman primates: implications for urinary tract cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, **90**(1): 19-25.

Takayama S, Sieber SM, Dalgard DW, Thorgeirsson UP, Adamson RH. 1999. Effects of long-term oral administration of DDT on nonhuman primates [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, **125**(3-4): 219-225.

Takayama S, Thorgeirsson UP, Adamson RH. 2008. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **84**(6): 176-188.

Tavassoli FA, Casey HW, Norris HJ. 1988. The morphologic effects of synthetic reproductive steroids on the mammary gland of rhesus monkeys. Mestranol, ethynerone, mestranol-ethynerone, chloroethynyl norgestrel-mestranol, and anagestone acetate-mestranol combinations [J]. *Am J Pathol*, **131**(2): 213-234.

Thorgeirsson UP, Dalgard DW, Reeves J, Adamson RH. 1994. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates [J]. *Regul Toxicol Pharmacol,* **19**(2): 130-151.

Yamate J, Tomita A, Kuwamura M, Mitsunaga F, Nakamura S. 2007. Spontaneous peritoneal malignant mesothelioma in a geriatric japanese macaque (*Macaca fuscata*) [J]. *Exp Anim*, **56**(2): 155-159.

Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Gan YC, Yang C, Huang GH. 1996. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. II. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1 [J]. *J Cancer Res Clin Oncol,* **122**(5): 289-295.

Uno H, Alsum P, Zimbric ML, Houser WD, Thomson JA, Kemnitz JW. 1998. Colon cancer in aged captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. *Am J Primatol,* **44**(1): 19-27.

Valerio MG. 1989. Comparative aspects of contraceptive steroids: effects observed in the monkey [J]. *Toxicol Pathol*, **17**(2): 401-410.

Wakisaka S, Kemper TL, Nakagaki H, O'Neill RR. 1982. Brain tumors induced by radiation in rhesus monkeys [J]. *Fukuoka Igaku Zasshi,* **73**(10): 585-594.

Werner J, Henle G, Pinto CA, Haff RF, Henle W. 1972. Establishment of continuous lymphoblast cultures from leukocytes of gibbons (*Hylobates lar*) [J]. *Int J Cancer*, **10**(3): 557-567.

Wood CE, Register TC, Lees CJ, Chen H, Kimrey S, Cline JM. 2007. Effects of estradiol with micronized progesterone or medroxyprogesterone acetate on risk markers for breast cancer in postmenopausal monkeys [J]. *Breast Cancer Res Treat,* **101**(2): 125-134.

Wood CE, Usborne AL, Starost MF, Tarara RP, Hill LR, Wilkinson LM, Geisinger KR, Feiste EA, Cline JM. 2006. Hyperplastic and neoplastic lesions of the mammary gland in macaques [J]. *Vet Pathol*, **43**(4): 471-483.

Wood DH. 1991. Long-term mortality and cancer risk in irradiated rhesus monkeys [J]. *Radiat Res,* **126**(2): 132-140.

Wright JW, Stouffer RL, Rodland KD. 2005. High-dose estrogen and clinical selective estrogen receptor modulators induce growth arrest, p21, and p53 in primate ovarian surface epithelial cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab,* **90**(6): 3688-3695.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 81−90 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01081

非人灵长类动物模型睡眠研究在神经精神疾病的早期诊断和药效评价中的作用

BACK

陈艳梅[1]，秦冬冬[1,4]，姜慧慧[1,4]，胡新天[1,2,3,*]，马原野[1,2,3,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223; 2. 中国科学院生物物理研究所 脑与认知国家重点实验室，北京 100101; 3. 中国科学院生物物理研究所，北京 100101; 4. 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要：清醒−睡眠的周期性调节需要众多单胺类神经递质(5-HT、NE、DA 等)、乙酰胆碱等兴奋性神经递质以及 GABA 等抑制性神经递质的参与。这些递质系统的异常不仅会导致睡眠周期紊乱，还与一系列的精神性和神经退行性疾病相关。睡眠异常被认为是抑郁症、帕金森氏病等神经系统疾病发生的早期预警信号。相比起低等哺乳动物，非人灵长类动物的睡眠与人类的睡眠具有更好的可比性。近来，利用非人灵长类动物来建立神经精神疾病模型的研究已取得明显进展。在建模的同时监测动物的睡眠状况，有助于我们进一步了解睡眠在这些疾病早期诊断和发展过程中的作用，为疾病的早期诊断、治疗和药效评价提供更好的客观依据。

关键词：睡眠；非人灵长类；神经精神疾病；疾病模型；早期诊断；药效评价
中图分类号：R-332;R749; R338.64; Q 959.848 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0081-10

Sleep disorder, a potential early diagnostic marker for psychiatric and neurodegenerative diseases

CHEN Yan-Mei[1], QIN Dong-Dong[1,4], JIANG Hui-Hui[1,4], HU Xin-Tian[1,2,3,*], MA Yuan-Ye[1,2,3,*]

(1. *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming Yunnan* 650223, *China*; 2. *State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science*, *Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Science*, *Beijing* 100101, *China*; 3. *Institute of Biophysics*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100101, *China;* 4. *Graduate University of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Sleep/circadian timing depends on several neurotransmitter systems, including 5-HT, NE, DA, Ach, GABA, *etc.* These neurotransmitter systems play critical roles in mental, emotional and cognitive functions in the brain. Dysfunctions of these systems not only result in sleep disorder, but are also related to many psychiatric and neurodegenerative diseases. Sleep disruption is tightly associated with an increased susceptibility to a broad range of psychiatric and neurodegenerative diseases, such as depression and Parkinson diseases. Non-human primates, especially the rhesus monkey is an excellent biomedical model for human sleep and CNS diseases. Establishing nonhuman primates' model of mental disorders and monitoring the sleep changes during the development of the model will help us to know more about the relationships between sleep disorder and psychiatric and neurodegenerative diseases. Sleep disorder as an early marker for psychiatric and neurodegenerative diseases would permit early intervention of these diseases and draw attention to the potential therapeutic benefits of normalizing sleep rhythms in individuals with brain pathologies.

Key words: Sleep; Non-human primates; Psychiatric/neurodegenerative disorder; Early disease diagnoses; Disease model; Drug efficacy test

1 睡眠调节的脑结构及相关的神经递质

睡眠是人类和大部分动物必不可少的生理需求。睡眠与清醒是两个截然不同的生存状态，相对于意识清醒时刻，睡眠时机体对外界的反应较差，嗅觉、视觉、听觉、触觉等感觉减退，以及体温下

收稿日期：2010-12-15；接受日期：2011-01-06
基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-EW-R-11）;中国科学院基础前沿研究专项项目（KSCX2-EW-J-23）资助
*通讯作者(Corresponding authors), E-mail: xthu@mail.kiz.ac.cn; yuanma0716@vip.sina.com
第一作者简介：陈艳梅，女，中国科学院昆明动物研究所 08 级博士，专业方向为神经生物学，E-mail：chyanm2@126.com

降、代谢率降低、呼吸变慢，意识与外界隔离等。

睡眠与清醒之间的相互转化是脑内许多神经递质的释放或抑制引起的，调节这一变化的主要神经机制是位于下丘脑前部的睡眠促进神经元(sleep-promoting neurons)和位于下丘脑外侧部和后部的睡眠抑制神经元(sleep-inhibiting neurons)，这些神经元分别释放兴奋性或抑制性的神经递质，激活或抑制位于脑干的上行激活系统(arousal-promoting systems)，控制清醒和睡眠的相互转化(Pace-Schott & Hobson, 2002)。

如图 1 所示，上行激活系统主要由两个通路构成：一条通路为乙酰胆碱通路，起源于脑桥上部的脑桥脚(pedunculopontine, PPT)和背外侧中脑被盖核(laterodorsal tegmental nuclei , LDT)，这些乙酰胆碱神经元的输入有助于丘脑−皮层间的信息传递，维持大脑皮层的激活状态。第二条通路主要由单胺类的神经递质负责，如结节乳头体核(tuberomammillary nucleus, TMN)神经元分泌的组氨酸(His)，中脑多巴胺能神经元释放的多巴胺(DA)，中缝核神经元释放的 5-HT 和蓝斑核神经元释放的去甲肾上腺素(NE)，主要负责激活大脑皮层的广泛区域，进而提高来自丘脑的信息处理能力。上行激活系统同时还接受来自下丘脑外侧部(lateral hypothalamus, LHT)的阿立新(orexin)神经元的投射，并受黑色素聚集激素(melanin-concentrating hormone)的调节。清醒时，脑干、中脑和基底前脑的一些脑区释放兴奋性的神经递质，如去甲肾上腺素，血清素(5-HT)，组氨酸，乙酰胆碱和阿立新(orexin)等，不断激活脑干的上行激活系统，进而维持动物的清醒状态（见图 2）(Saper et al, 2005)。

脑干上行激活系统中的许多脑区都受到腹外侧视前叶核团(ventrolateral preoptic nucleus, VLPO)的直接调控，腹外侧视前叶核团的睡眠促进神经元能够分泌 GABA 和甘丙肽(Galanin, Gal)这两种抑制性神经递质。清醒时，腹外侧视前叶核团的抑制性神经递质，如 GABA 和甘丙肽的释放受到抑制，但随着清醒时间的增多，ATP 分解产生的腺苷不断积累，而腺苷的不断积累又会导致睡眠压力的增加。大量的腺苷使基底前脑的 GABA 能神经元受到抑制，使得 GABA 对睡眠促进神经元的抑制被解除，

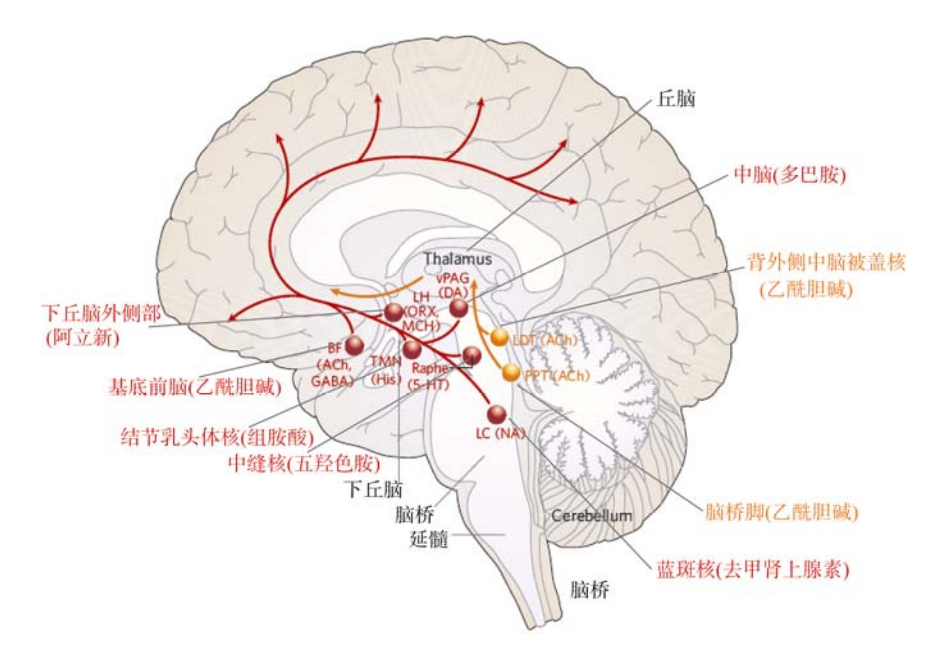


图 1 脑内上行激活系统的主要结构

Fig. 1 Key components of the ascending arousal system

上行激活系统由两条通路构成：第一条通路(黄色线表示)的乙酰胆碱系统有助于丘脑-皮层间的信息传递；第二条通路(红色线表示)负责激活大脑皮层的广泛区域，进一步提高来自丘脑信息的处理能力，主要由单胺类的神经递质介导，同时还接受 orexin 神经元的投射，并受黑色素聚集激素(melanin-concentrating hormone)的调节以及 GABA 神经元和 Ach 神经元的调节(引自 Saper et al, 2005，略有改动)。

The ascending arousal system has two separate pathways: the first pathway (yellow) originates from cholinergic (ACh) cell groups, facilitates the thalamocortical transmission. The second pathway (red) arises from neurons in the monoaminergic cell groups, activates the cerebral cortex to facilitate the processing of inputs from the thalamus, this pathway also receives contributions from orexin neurons or melanin-concentrating hormone (Modified from Saper et al, 2005).

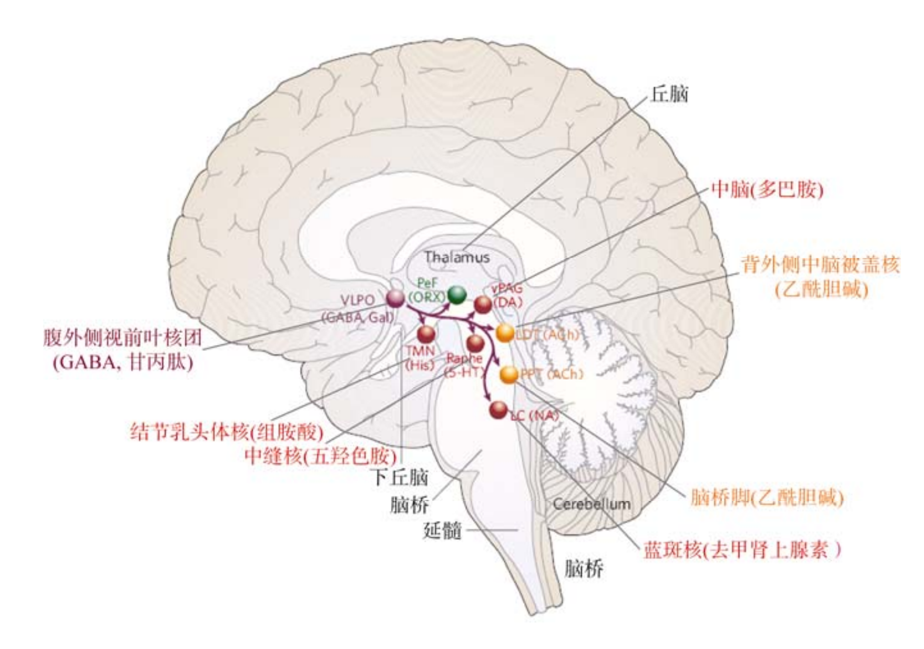


图 2　腹外侧视前叶核团的睡眠促进神经元对上行激活系统的投射

Fig. 2　Key projections of sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) to the main components of the ascending arousal system

腹外侧视前叶核团(VLPO)的睡眠促进神经元释放 GABA 和甘丙肽这两种抑制性神经递质，这些递质直接作用于上行激活系统中的许多主要脑区，使得上行激活系统全面失活，动物进入睡眠状态(引自 Saper et al, 2005，略有改动)。

The release of inhibitory neurotransmitters GABA and galanin from sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) inhibit the key components of the ascending arousal system. With the inactivation of the ascending arousal system, animals drift off to sleep (Modified from Saper et al, 2005).

于是位于腹外侧视前叶核团的睡眠促进神经元便大量释放 GABA 和甘丙肽。这些递质直接作用于上行激活系统中的主要组成部分，如组胺酸(His)神经元、多巴胺(DA)神经元、5-HT 神经元以及蓝斑核的去甲肾上腺素(NE)神经元等。这些递质还会抑制脑桥脚(pedunculopontine ，PPT)和背外侧中脑被盖核(laterodorsal tegmental nuclei ，LDT)的乙酰胆碱神经元活动，使得位于脑干、中脑和基底前脑的上行激活系统全面失活，动物进入睡眠状态(Saper et al, 2005)。

正常情况下，成年人完整的睡眠由一系列持续时间大约为 90 分钟的睡眠周期组成。每个周期由非快速眼动睡眠(non-rapid eye movement sleep, NREM sleep)和快速眼动睡眠(rapid eye movement sleep, REM sleep)组成。进入睡眠状态后，首先是 NREM 睡眠，持续约 60～90 min 后进入 REM 睡眠，20～30 min 后又转入 NREM 睡眠；整个睡眠过程中，NREM 和-REM 睡眠约有 4～5 次交替(Sakurai et al, 2010)。睡眠前期以慢波睡眠为主，越到睡眠的后期，REM 睡眠的时间越长 (Diekelmann & Born, 2010)。在 NREM 睡眠和 REM 睡眠过程中，脑内释放不同种类的神经递质。NREM 睡眠时，脑内所有单胺能和胆碱能神经递质及 orexin 的释放都被腹外侧视前叶核团释放的 GABA 和甘丙肽所抑制。因此，出现动物唤起度下降的现象。一旦 NREM 睡眠开始，就可以在下丘脑–皮层之间的脑电 EEG 中记录到 θ 和 δ 振荡，以及睡眠纺锤波。而 REM 睡眠时，虽然脑干内单胺类神经递质的释放同样被抑制，但在 REM 睡眠中，起源于脑干、中脑和基底前脑的乙酰胆碱神经元却会释放出乙酰胆碱神经递质，脑内乙酰胆碱的含量在REM睡眠时最多，清醒时次之，而 NREM 睡眠时最低(Vazquez & Baghdoyan, 2001)。REM 睡眠的产生及调节被认为与乙酰胆碱神经元的活动有关，刺激脑桥部的胆碱能神经核团可诱发 PGO 棘波、肌肉弛缓和丘脑一皮质激醒(Hobson, 1992)。

总之，睡眠的调节与脑干、中脑和基底前脑等脑区的上行激活系统有关，上行激活系统内存在各种单胺类的神经递质和乙酰胆碱等兴奋性神经递质，也有 GAGA 和甘丙肽等抑制性神经递质，这些

递质的此消彼长, 促进了清醒和睡眠之间的相互转化, 一旦与上行激活系统相关的脑区发生病变或这些相关的神经递质释放出现异常, 就会出现睡眠周期的紊乱, 出现睡眠问题, 如入睡困难、睡眠状态难以维持、REM 睡眠潜伏期变化、REM 睡眠行为异常、REM-NREM 睡眠周期紊乱等。

2 睡眠异常是精神性疾病和神经退行性疾病发生的早期预警因子

通常情况下, 睡眠障碍, 如失眠一般伴随着疾病的发生而发生, 其本身并不被认为是一种疾病。人们普遍认为, 焦虑和抑郁症患者通常出现的失眠只要在相关的疾病得到有效治疗后, 睡眠便会恢复正常。然而, 越来越多的研究认为, 失眠本身就是一种原发性疾病, 当他与精神性疾病同时出现时, 应被视为一种并发症。这主要是基于以下几种发现(Pigeon et al, 2008): 第一, 周期性抑郁症患者在抑郁症状出现前均表现出失眠症状加重, 提示失眠有可能是抑郁出现的前驱征兆; 第二, 治疗抑郁症的临床用药并不能有效改善病人的睡眠状况; 第三, 抑郁症的认知疗法对睡眠障碍治愈效果不佳; 第四, 精神性疾病是阶段性的, 而睡眠障碍则是慢性的, 即使是在精神疾病发病的潜伏期, 失眠也会不断出现; 第五, 治疗失眠的药物与治疗抑郁的药物, 如氟西汀共同使用时, 对抑郁症的疗效显著高于单纯的氟西汀治疗, 说明在治疗抑郁症的同时, 对睡眠障碍进行治疗有助于抑郁症的痊愈; 第六, 越来越多的证据表明, 失眠患者在之后的 6 个月至 3 年内患上抑郁症的风险高于正常人。因此, 睡眠障碍不仅导致了睡眠障碍者烦恼于入睡困难、入睡后极易觉醒, 以及在不正确的时间里昏昏欲睡等睡眠问题, 更严重的是, 睡眠障碍患者相比起正常人来说, 可能更容易陷入一系列心理疾病及生理疾病的威胁中。

睡眠障碍, 如失眠是焦虑和抑郁症发展过程中的一个危险因子(Vollrath et al, 1989)。失眠既有可能是疾病、药物、酒精等因素引发的继发性反应, 也有可能是精神、心理的高唤起度引发的原发性反应。在一项对青少年(12～18 岁)的研究中发现, 大约 9.4%的人有睡眠障碍, 主要与饮酒、吸食大麻或大麻以外的药物、抑郁等有关, 他们在成年早期(18～25 岁)患上抑郁症的概率要高于正常人(Chang et al, 1997)。另外一项研究同样发现, 失眠患者 1～3 年内患上抑郁症的风险大于非失眠患者, 失眠是抑郁症出现的早期预警因子, 通过对失眠的早期治疗有可能会阻止后期抑郁症的发展(Riemann & Voderholzer, 2003)。

快速眼动(rapid-eye-movement, REM)睡眠行为异常(sleep behaviour disorder, RBD)是在 REM 睡眠状态下出现的行为异常, 如大声叫喊、拳打脚踢、滚下床等。正常情况下, REM 睡眠时人的运动机能降低、肌肉几乎完全松弛, 而 REM 睡眠行为异常的患者在 REM 睡眠时运动机能没有得到有效降低, 于是在经历不愉快的梦境时, 梦中出现的行为便会表现出来。REM 睡眠行为异常不仅会造成患者身体上的伤害, 严重时还危及生命(MD & MD, 2002)。REM 睡眠行为异常的发生有可能是先天性的, 也有可能与一些神经退行性疾病, 如帕金森、路易小体痴呆以及多器官萎缩有关(Postuma et al, 2006)。在先天性的 REM 睡眠行为异常中, 患者在清醒时没有运动及认知方面的障碍; 而在神经退行性疾病的 REM 睡眠行为异常中, 患者运动和认知障碍出现之前的许多年便会出现 REM 睡眠行为异常。有研究认为, 先天具有 REM 睡眠行为异常的人在之后的岁月中患上某种神经退行性疾病的可能性更大, 在一项研究中, 研究者发现, 在 29 位年龄大于 50 岁, 先前被诊断出具有 REM 睡眠行为异常的患者中, 38%的患者在之后的(3.7±1.4)年里被诊断出患有帕金森氏病, 另外有 7%的人在之后被诊断出患有其他类型的神经系统疾病(Schenck et al, 1996)。在另一项研究中, 研究者经过长时间的跟踪研究, 发现在 44 位已经被诊断为 REM 睡眠行为异常的平均年龄为 74 岁的老年人中, 有 45%的患者在 REM 睡眠行为异常首次出现之后的 11.5 年后发展出了不同性质的神经退行性疾病, 在明确诊断出 RBD 之后, 发病时间一般为之后的 5.1 年(Iranzo et al, 2006)。这些研究都说明 REM 睡眠行为异常是帕金森氏病等神经退行性疾病出现的先驱症状, 在医院的睡眠中心检测到 REM 睡眠行为异常的患者患上更严重疾病的可能性要高于 REM 睡眠正常的患者, 通过在 RBD 出现的早期进行适当的治疗有可能对这些疾病的治疗提供新的有效手段。

睡眠异常不仅可以作为疾病发生的早期预警因子, 在疾病的发展过程中, 睡眠周期紊乱会进一步影响到神经元和神经内分泌的正常功能, 损伤人的认知、情绪调节等功能, 睡眠障碍会导致机体出

现一系列不同于正常人的症状，如代谢失常、免疫力低下、患癌症或心脑血管疾病的风险增加等(Wulff et al, 2010)。此外，睡眠周期紊乱还会影响到人的正常社会活动。睡眠周期紊乱的患者作息时间与常人不同，其社会行为会发生相应的变化，患者不规律的睡眠还会使其接受正常光照刺激的几率降低，这些都将导致睡眠周期调节的进一步失衡，使得脑内本来已经失常的递质释放系统进一步紊乱，机体内部的各类激素和行为节律失去同步性。除此之外，药物治疗、成瘾药物的摄入和药物滥用同样会影响到患者脑内正常的神经递质释放，进一步损坏神经元和神经内分泌的调控，睡眠周期进一步失衡。因此，对具有睡眠异常的精神性疾病和神经退行性疾病患者进行提高睡眠质量的治疗，将有助于疾病的更好治疗。

3　睡眠障碍与精神疾病和神经退行性疾病研究实例

许多精神性疾病和神经退行性疾病的核心病理改变都是脑内神经递质信息传递的失常，如抑郁症与脑内 5-HT 水平低下有关，帕金森病患者的多巴胺神经元出现异常等。目前用于治疗这类疾病的药物也主要是基于校正这些神经递质的异常分泌。从上一部分对睡眠调节的总结我们可以看出，睡眠周期的调节需要众多单胺类、乙酰胆碱、GABA 等神经递质的正常工作，可以说，睡眠调节与心理、情绪、认知等方面的调节具有共同的物质基础(Wulff et al, 2010)。

研究发现，一系列的精神疾病和神经退行性疾病都伴随着睡眠周期的紊乱，如睡眠时间与睡眠时相的改变等(表 1)。在超过 80%的抑郁症和精神分裂症患者中都会出现睡眠障碍，阿尔兹海默病和帕金森病等神经退行性疾病患者中也会出现睡眠周期的紊乱。事实上，很多对精神性疾病的诊断标准中都包括睡眠行为的变化，如美国精神病学会编制的《精神疾病诊断与统计手册》(DSM-Ⅳ)和世界卫生组织编写的《国际疾病分类》等。

表 1　各种精神性及神经退行性疾病的睡眠改变
Tab. 1　Sleep changes in psychiatric and neurodegenerative diseases

疾病名称 Disease	抑郁症 Depression	精神分裂症 Schizophrenia	阿尔兹海默病 Alzheimer’s disease	帕金森氏病 Parkinson disease
睡眠异常的表现 Sleep disorder	REM 睡眠潜伏期下降 首次 REM 睡眠时间增长 REM 睡眠中眼动减少 慢波睡眠减少 皮质醇浓度异常	慢波睡眠缺失 REM 睡眠潜伏期下降 REM 睡眠反弹缺失 清醒−睡眠周期节律紊乱 睡眠纺锤波减少	夜间清醒 K-复合波及纺锤波异常 REM 睡眠及清醒时脑电β波减少 慢波睡眠减少 白天睡眠增多	失眠 REM 睡眠行为异常 REM/NREM 睡眠失常 白天睡眠增多
参考文献 References	(Berger & Riemann, 1993; Sabo & Reynolds, 1991; Sitaram et al, 1982)	(Cohrs, 2008; Ferrarelli et al, 2007)	(Wulff et al, 2010; Vitiello et al, 1990)	(Arnulf et al, 2008; Iranzo et al, 2006)

3.1　重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)患者的睡眠异常

超过 90%的重度抑郁症患者会出现睡眠障碍。对抑郁症患者的睡眠研究发现，REM 睡眠异常与抑郁症的发生有关(Sitaram et al, 1982)，抑郁症患者第二阶段的 REM 睡眠比正常人多。睡眠异常可以作为抑郁症早期诊断的一个指标，REM 睡眠潜伏期减少，REM 睡眠密度增加以及 REM 睡眠增多有可能是抑郁症发病的早期预警信号(Berger & Riemann, 1993)。另外，在抑郁症患者中，有过自杀行为的抑郁症患者睡眠潜伏期更长，睡眠效率更低，睡眠过程中的深度睡眠更少(睡眠 δ 波的出现次数减少)，而没有自杀行为的抑郁症患者第二阶段 REM 睡眠时间较少，深度睡眠较多，说明睡眠紊乱的程度与抑郁症的严重程度有一定相关性(Sabo & Reynolds, 1991)。

失眠也是抑郁症发病的前期危险因子(risk factor)，失眠患者在患病后 1～3 年时间内患上抑郁症的可能性比睡眠正常的人要高(Riemann & Voderholzer, 2003; Cole & Dendukuri, 2003)。不仅如此，失眠还会进一步加重抑郁症患者的病情，使患者发展出新的抑郁症状。在抑郁症的治疗过程中，失眠患者得到有效治疗的几率更低，失眠患者经过一般治疗后仍保持抑郁症状的几率是非失眠患者

的 1.8～3.5 倍(Pigeon et al, 2008), 说明睡眠障碍会阻碍抑郁症的正常治疗。

对睡眠周期的调节有利于抑郁症的康复和治疗。一些抗抑郁药的疗效被认为与其对睡眠的调节作用有关。治疗抑郁症的一些三环类或非三环类抗抑郁药, 如丙咪嗪、阿米替林等都具有镇静效果, 在催眠实验中被用作催眠药物。催眠剂(如唑吡坦)或褪黑素激动剂等药物能提高使用者的睡眠质量, 使人的入睡潜伏期下降, 睡眠稳定性升高等, 这些药物同时也能够改善失眠者和抑郁症患者的睡眠问题, 对提高使用者的心境状况有利。在一些对传统抗抑郁药不敏感的患者身上使用能够促进清醒状态的药物莫达非尼, 调整患者的睡眠周期节律, 可以减轻患者的抑郁症状, 对提高抑郁患者的生存质量有益(Asnis et al, 1999)。

3.2 精神分裂症患者的睡眠异常

精神分裂症患者的睡眠障碍早在 20 世纪 20 年代就被研究报道了。30%～80%的精神分裂症患者都有睡眠不同程度的睡眠问题。睡眠质量越差, 患者的生存质量越低。在精神分裂症患者中, REM 睡眠的潜伏期减少, REM 睡眠密度、睡眠有效性、睡眠总时间以及 NREM 睡眠 4 期的时间都减少(Cohrs, 2008)。精神分裂症患者 NREM 睡眠中的睡眠纺锤波数量、幅度、持续时间以及整体性都下降(Ferrarelli et al, 2007)。精神分裂症患者睡眠质量的提高与负性症状的减轻相关。

精神分裂症患者的睡眠异常与其脑部结构及神经生理学上的广泛病变有关。Hendler et al (2009)研究表明, 精神分裂症患者脑内与 GABA 有关的抑制性神经通路功能失常, 皮质醇浓度也普遍高于正常人。此外, 精神分裂症患者皮层神经纤维网减少, 海马神经元数量降低, 在儿童时期便会出现皮层灰质的萎缩。

与精神分裂症有关的基因中有好几种都与睡眠周期节律调节有关, 如 *DISC1* (disrupted in schizophrenia 1) 基因和 *PDE4D* (cyclic AMP (cAMP)-specific 3′,5′-cyclic phosphodiesterase 4D)基因等。 DISC1 基因的异常与动物的快感缺乏和睡眠调节紊乱有关 (Sawamura et al, 2008); 而 PDE4D 多态性变化与失眠有关, 并且与精神分裂症的发病有关(Tomppo et al, 2009)。

3.3 老年痴呆患者的睡眠异常

阿尔兹海默病(Alzheimer’s disease, AD)的退行性发病过程会从多个方面影响到睡眠调节有关的脑区, 睡眠异常被看作是该病早期发展过程中的标志性反应(Jeong, 2004)。下丘脑前部的腹外侧视前叶核团(VLPO)和视交叉上核、下丘脑外侧部和下丘脑后部以及基底前脑都是睡眠周期调节的重要脑区, 而 AD 患者的这些脑区都会出现神经退行性变化, 尤其是视交叉上核, AD 患者的神经病理学症状显著高于同年龄的正常人(Hoogendijk et al, 1997)。由于 AD 患者基底前脑和 VLPO 脑区的损伤, VLPO 对脑干上行网状激活系统的抑制不能正常发生, 导致 AD 患者慢波睡眠减少和 NREM 睡眠 1 期增加。除此之外, AD 患者 NREM 睡眠 2 期的特征脑电波, 如 K-复合波、纺锤波几乎不会形成, 即使是形成了其幅度也很小, 持续时间较短, 数量较少(Wulff et al, 2010)。此外, 在 AD 出现的早期便会出现基底前脑乙酰胆碱神经元的变性, 而基底前脑乙酰胆碱神经元向皮层的投射被认为是 REM 睡眠过程中大脑皮层兴奋的主要原因, 乙酰胆碱神经元的损伤被认为是 AD 患者 REM 睡眠紊乱的重要原因(Vitiello et al, 1990)。

3.4 帕金森病患者的睡眠异常

帕金森患者的中脑“黑质”神经元出现路易小体(Lewy body)沉积, 导致该区域神经元细胞的死亡, 进一步导致纹状体部位的多巴胺神经元变性, 多巴胺合成减少, 抑制乙酰胆碱的功能降低, 两者失衡的结果使患者出现了“震颤麻痹”, 不仅如此, 多巴胺、乙酰胆碱等神经递质释放的紊乱还会破坏正常的睡眠周期调节。帕金森病患者经常会出现夜间睡眠障碍及白天昏昏欲睡的现象, 约有 80%～90%的 PD 患者会出现入睡困难, 睡眠状态难以保持等现象。然而, Lewy 小体沉积不止是在黑质发生, 在脑干的核团中也会出现 Lewy 小体沉积, 这些核团的退行性变化会从根本上破坏 REM 睡眠和 NREM 睡眠的结构。研究表明, REM 睡眠的异常在 PD 症状出现之前好多年便会出现(Arnulf et al, 2008), 该研究提示我们, REM 睡眠有可能是 PD 疾病的早期症状, 为该病的早期诊断提供了依据。在 PD 治疗方面, 研究表明, 调节睡眠周期节律的褪黑素和光照疗法能显著提高 PD 患者的睡眠质量。

总之, 当神经退行性疾病导致的脑损伤涉及到与睡眠调节有关的脑区和睡眠调控的神经递质时, 睡眠异常便会产生。对神经退行性疾病患者的睡眠障碍进行治疗或许能缓解疾病的症状, 延缓疾病的

发展进程, 进一步提高患者的整体生存质量。

4　非人灵长类动物的睡眠研究

睡眠研究早在 20 世纪 20~30 年代就得到研究者的广泛关注, 早期的睡眠研究主要以人或猫作为动物模型来进行。随着研究不断深入, 研究者发现, 低等哺乳动物, 如猫的睡眠与人类存在许多不同的地方, 其中的一个重要差别就是猫通常只有两个睡眠时相, 即包含睡眠纺锤波的慢波睡眠和异相睡眠, 而人类的睡眠通常可以被明显地分为很多个时相, 即 NREM 睡眠 1 期、2 期, 慢波睡眠 (NREM 睡眠 3、4 期)和异相睡眠。低等哺乳动物的睡眠和人类的睡眠差别的另外一个方面是, 在猫和大鼠睡眠过程中, 通常可以在海马处记录到明显的 theta 波, 而在人类睡眠中没有这种特征波(Cantero et al, 2003)。

对非人灵长类(non-human primates)动物的研究为睡眠研究提供了一个更好的研究模式。研究表明, 与低等哺乳动物不同, 非人灵长类的睡眠与人类的睡眠极为相似(Weitzman et al, 1965)。与人类一样, 非人灵长类动物在夜晚有着稳定的睡眠, 并且在白天会出现一些小睡。非人灵长类动物中的许多种, 如狒狒、大狒狒、肯尼亚狒狒、南非小猿猴、猕猴、食蟹猴、派达猴、獴狐猴、黑猩猩等都可以用来研究睡眠, 但通过比较这几种非人灵长类动物的睡眠, 研究者普遍认为黑猩猩(chimpanzee)、狒狒(olive baboon)和猕猴(rhesus monkey)是研究非人灵长类和人类之间比较生物学的较好模式动物, 尤其是猕猴, 由于其稳定而完善的睡眠研究系统以及处理和饲养方面的简易性, 猕猴已经成为比较生物学研究的最好的模式生物 (Balzamo et al, 1977; Deadwyler et al, 2007)。

与黑猩猩和人类相似, 猕猴的睡眠模式与低等哺乳动物差别很大(Weitzman et al, 1965)。在猕猴的睡眠过程中, 睡眠的各种特征脑电波可以被很轻易地区分出来。此外, 猕猴的睡眠也会出现与人类睡眠中相似的周期性脑电变化, 在整夜的睡眠中, 猕猴睡眠在清醒—NREM 睡眠—REM 睡眠的交替中进行。在对猕猴进行的每天的睡眠监测中发现, REM 睡眠占总睡眠的 15%, 每次 REM 睡眠持续约 6 min 每 51 分钟出现一次, 人类中, 这个周期的间隔时间大约 90 min, 而在大鼠中, 这个间隔时间仅为 13 min。与人类睡眠相似, 猕猴睡眠过程中海马处也不能记录到明显的 theta 波 (Kripke et al, 1968; Hsieh et al, 2008)。

在最近的一项对自由活动猕猴进行的睡眠研究中发现, 猕猴 8 小时的睡眠监测过程中, 有 89.2%的时间处于睡眠状态, 而在 16 h 的白天监测过程中, 有约 25.2%的时间处于睡眠状态。猕猴每天的睡眠总时间约为 10.5 h, 在整个睡眠过程中, REM 睡眠, 占 23%, NREM-REM 周期性活动约 60 min 出现一次, 代表睡眠稳定性的脑电 δ 波的活动通常在睡眠之后的 3～4 h 出现, 在睡眠的早期主要以深度睡眠如慢波睡眠(NREM 睡眠 3、4 期)为主, 而睡眠晚期主要以 REM 睡眠为主, 这些睡眠特征都与人类睡眠有着极大的相似性, 这些数据进一步说明, 猕猴是研究人类睡眠及睡眠的生物学特性的一种非常好的模式动物（见图 3；Hsieh et al, 2008)。

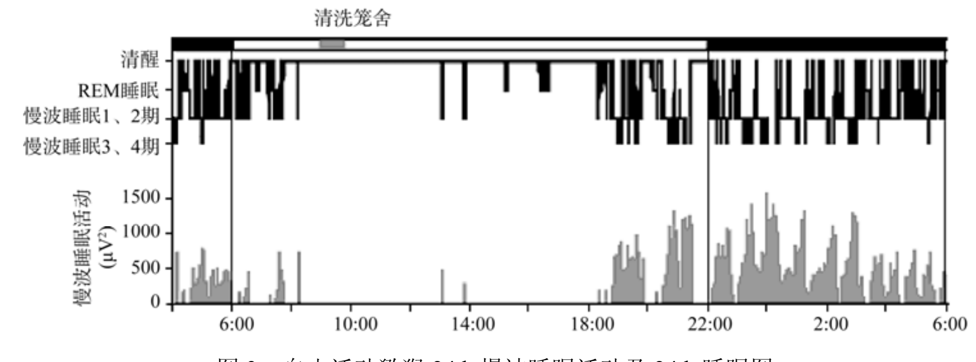


图 3　自由活动猕猴 24 h 慢波睡眠活动及 24 h 睡眠图

Fig. 3　Slow wave activity over 24 h, and 24 h hypnogram of an unrestrained rhesus monkey

图中上半部分显示的是 24 h 多导睡眠图整个记录过程中睡眠时相变化, 下半部分显示的是 NREM 睡眠时的慢波睡眠活动(引自 Hsieh et al, 2008, 略有改动)。

The upper part of this figure shows the sleep stages, and the lower part shows slow wave activities during NREM sleep in the 24-h hypnogram (Modified from Hsieh et al, 2008).

综上所述，越来越多的研究表明，非人灵长类动物的睡眠与人类睡眠模式极为相似，它是深入研究人类睡眠和睡眠病理学的很好的模式动物。

5 非人灵长类动物疾病模型研究与睡眠研究相结合

建立疾病的动物模型是人类疾病病理研究和药物开发的重要手段。与啮齿类等低等哺乳动物相比，非人灵长类动物由于在遗传学、解剖结构和生理功能上与人类的高度相似性而成为许多精神疾病模型建立的理想实验动物。首先，非人灵长类动物具有与人类相似的大脑结构，具备高级脑功能，可以被训练完成特定类型的测试任务，对评价认知能力、情绪反应等具有啮齿类动物无法替代的作用(Price et al, 1991)；其次，非人灵长类动物的前额叶皮层和杏仁核与人类一样，具有调控情感与动机的功能(Drevets, 2001)，这使得它们在面对应激刺激时所表现出的反应与人类非常相似，包括：回避行为、警觉和觉醒水平的提高、自主神经系统的交感神经系统被激活、肾上腺分泌皮质醇等；再次，与脑内五羟色胺系统正常功能密切相关的基因5-HTTLPR(五羟色胺转运体基因启动子区多态性)仅存在于人类和猕猴科动物中(Lesch et al, 1997)；最后，非人灵长类动物的行为表现与人类非常相似，同样生活在社会群体中，具有复杂、高级的认知过程，情感表达(喜、怒、哀、乐)也与人类相似(Barr et al, 2003; Kalin & Sheltona, 2003)。

利用非人灵长类动物来建立人类疾病动物模型已取得重大进展。非人灵长类动物会自发产生一些与人类相似的疾病，如老年时期会患上与老年人相似的神经退行性疾病，像阿尔兹海默病(AD)等，老年猴在认知和记忆测试中的表现较年轻猴差，老年猴脑内还会出现神经元变性、神经元轴突和树突异常，在神经元胞体、近端树突和轴突中还会出现淀粉样蛋白沉积，与老年斑中和血管周围的β淀粉肽沉积共同存在。老年猴还会出现某些神经递质通路的退化，如基底前脑的乙酰胆碱系统，这些神经递质的异常是导致老年动物认知和记忆能力下降的因素之一(Price et al, 1991)。除了天然发生的疾病，在经过特定的人工诱导，如药物损伤、转基因、手术损伤或自身免疫损伤等方法处理之后，非人灵长类动物可以被诱导出许多与人类疾病相似的病理及行为变化，以阿尔兹海默病(AD)疾病模型为例，非人灵长类动物，尤其是猕猴的 AD 模型，具有与人类一致的神经生物学特性，是研究 AD 等疾病最理想的动物模型(Lemere et al, 2004)。

在非人灵长类动物疾病模型建立方面，我们实验室依托于中国科学院昆明灵长类研究中心及中国科学院昆明动物研究所，拥有雄厚的非人灵长类实验动物资源。目前为止，我们已经成功建立起了猕猴的帕金森氏病疾病模型，PD 猴表现出与 PD 患者相似的临床症状，如震颤、运动减少、僵直、姿势异常等，在神经病理学方面，这些猕猴还出现了脑内多巴胺转运体减少、多巴胺神经元死亡等现象。我们实验室还成功建立了猕猴的抑郁症模型，抑郁猴的行为表现、HPA 轴异常等方面都与抑郁病人极为相似。除此之外，我们实验室在建立猕猴的 AD 模型方面也取得了很大进展。总而言之，在非人灵长类动物疾病模型的建立方面，我们实验室已经具备了完善的实验条件和实验技术，建立模型的方法日趋成熟。

在以往的研究非人灵长类动物睡眠的实验中，为了电生理记录的方便，通常需要把猴子固定在猴椅上，这样就限制了动物的活动性，其研究结果必然与动物在自然状态下的真实表现不同。研究表明，身体活动受限的狒狒会出现一定程度的睡眠异常，如睡眠−清醒模式被打乱，不正常的瞌睡和注意力下降等。虽然在猕猴上没有相似的研究，但有研究表明，猴椅限制会影响到猕猴的正常行为。为了规避这些睡眠研究中的障碍，我们实验室经过不断地研究改进，研究出了一种可以同时记录脑电、肌电、眼电等睡眠研究所需参数的记录仪，该记录仪体积较小(尺寸 5.2 cm×7.7 cm×4.0 cm)，重量较轻，可以通过手术的方式埋植在猕猴的头部，而且记录仪不会对猕猴的正常活动和生理状态造成影响。与传统的睡眠记录方式相比，该记录方法具有以下优势：1)睡眠记录仪自带小型的电生理记录和存储设备，不存在记录线对猕猴自由活动的限制；2)可以稳定记录自由活动猕猴每天 24 h 的清醒−睡眠状态长达半个多月；3)记录到的数据与用以往方法记录到的数据具有可比性，可以较真实地反映动物的睡眠状态。利用这种方便有效的实验手段，我们实验室已经建立起完备的研究非人灵长类动物睡眠的实验平台，可以对猕猴等非人灵长类动物的睡眠进

行深入研究。

6 小结与展望

非人灵长类动物与人类相似的睡眠模式和疾病发生机理，使其成为一种理想的动物模型，可以用来研究疾病与睡眠之间的相互关系。我们实验室经过多年的探索，已成功建立了和正在建立猕猴的帕金森、老年痴呆、抑郁症等疾病的动物模型；在猕猴的睡眠研究方面，我们也具备了完善的实验条件和实验设备。上文已经提到，抑郁症、帕金森、早老性痴呆症等疾病在发病之前都会出现某种程度上的睡眠异常，睡眠异常是诸多精神性或神经退行性疾病发病的早期预警因子，睡眠异常的程度还可以作为疾病严重程度的指标等。因此，通过在建立动物疾病模型的过程中同时监测动物的睡眠状况，我们可以进一步了解随着建模的不断进行，睡眠异常是怎样一步步发生的。掌握这一点后，我们就可以通过检测睡眠的正常与否来判断疾病发生的可能性及疾病发展的进程，这将有助于我们深入研究睡眠作为疾病早期预警因子的原理，为人类疾病的早期诊断提供可靠的依据。在出现睡眠异常这种疾病早期预警因子之后，通过合适的手段对疾病进行早期干预和治疗，有可能推迟疾病发生的时间或把疾病的发生遏制在萌芽状态，有利于疾病的控制。这项工作，对于人类精神性和神经退行性疾病的早期诊断、预防和治疗都具有重要的现实意义。

参考文献：

Arnulf I, Leu S, Oudiette D. 2008. Abnormal sleep and sleepiness in Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurol,* **21**: 472-477.

Asnis GM, Chakraburtty A, DuBoff EA, Krystal A, Londborg PD, Rosenberg R, Roth-Schechter B, Scharf MB, Walsh JK. 1999. Zolpidem for persistent insomnia in SSRI-treated depressed patients [J]. *J Clin Psychiatry,* **60**: 668-676.

Balzamo E, Santucci V, Seri B, Vuillon-Cacciuttolo G, Bert J. 1977. Nonhuman primates: laboratory animals of choice for neurophysiologic studies of sleep [J]. *Lab Anim Sci,* **27**: 879.

Barr CS, Newman TK, Becker ML, Parker CC, Champoux M, Lesch KP, Goldman D, Suomi SJ, Higley JD. 2003. The utility of the non - human primate model for studying gene by environment interactions in behavioral research [J]. *Genes Brain Behav,* **2**: 336-340.

Berger M, Riemann D, 1993. REM sleep in depression - an overview [J]. *J Sleep Res,* **2**: 211-223.

Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B. 2003. Sleep-dependent {theta} oscillations in the human hippocampus and neocortex [J]. *J Neurosci,* **23**: 10897-10903.

Chang PP, Ford DE, Mead LA, Cooper-Patrick L, Klag MJ. 1997. Insomnia in young men and subsequent depression: the Johns Hopkins Precursors Study [J]. *Am J Epidemiol,* **146**: 105-114.

Cohrs S, 2008. Sleep disturbances in patients with schizophrenia: impact and effect of antipsychotics [J]. *CNS drugs,* **22**: 939-962.

Cole MG, Dendukuri N. 2003. Risk factors for depression among elderly community subjects: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Psychiatry,* **160**: 1147-1156.

Deadwyler SA, Porrino L, Siegel JM, Hampson RE. 2007. Systemic and nasal delivery of orexin-A (Hypocretin-1) reduces the effects of sleep deprivation on cognitive performance in nonhuman primates [J]. *J Neurosci,* **27**: 14239-14247.

Diekelmann S, Born J. 2010. The memory function of sleep [J]. *Nat Rev Neurosci,* **11**: 114-126.

Drevets WC. 2001. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders [J]. *Curr Opin Neurobiol,* **11**: 240-249.

Ferrarelli F, Huber R, Peterson MJ, Massimini M, Murphy M, Riedner BA, Watson A, Bria P, Tononi G. 2007. Reduced sleep spindle activity in schizophrenia patients [J]. *Am J Psychiatry,* **164**: 483-492.

Hendler T, Bleich-Cohen M, Sharon H. 2009. Neurofunctional view of psychiatry: clinical brain imaging revisited [J]. *Curr Opin Psychiatry,* **22**: 300-305.

Hobson JA. 1992. Sleep and dreaming: induction and mediation of REM sleep by cholinergic mechanisms [J]. *Curr Opin Neurobiol,* **2**: 759-763.

Hoogendijk WJG, van Someren EJW, Mirmiran M, Hofman MA, Lucassen PJ, Zhou JN, Swaab DF. 1997. Circadian rhythm-related behavioral disturbances and structural hypothalamic changes in Alzheimer's disease [J]. *Int Psychogeriatr,* **8**: 245-252.

Hsieh KC, Robinson EL, Fuller CA. 2008. Sleep architecture in unrestrained rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) synchronized to 24-hour light-dark cycles [J]. *Sleep,* **31**: 1239-1250.

Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaría J, Serradell M, Martí MJ, Valldeoriola F, Tolosa E. 2006. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study [J]. *Lancet Neurol,* **5**: 572-577.

Jeong J. 2004. EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease [J]. *Clin Neurophysiol,* **115**: 1490-1505.

Kalin N, Sheltona SE. 2003. Nonhuman primate models to study anxiety, emotion regulation, and psychopathology [J]. *Ann N Y Acad Sci,* **1008**: 189-200.

Kripke DF, Reite ML, Pegram GV, Stephens LM, Lewis OF. 1968. Nocturnal sleep in rhesus monkeys [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol,* **24**: 581-586.

Lemere CA, Beierschmitt A, Iglesias M, Spooner ET, Bloom JK, Leverone JF, Zheng JB, Seabrook TJ, Louard D, Li D. 2004. Alzheimer's disease A {beta} vaccine reduces central nervous system a {beta} levels in a non-human primate, the Caribbean vervet [J]. *Am J Pathol,* **165**: 283-297.

Lesch KP, Meyer J, Glatz K, Flügge G, Hinney A, Hebebrand J, Klauck SM, Poustka A, Poustka F, Bengel D. 1997. The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in evolutionary perspective: alternative biallelic variation in rhesus monkeys[J]. *J Neural Transm,* **104**: 1259-1266.

MD CHS, MD MWM, 2002. REM sleep behavior disorder: clinical, developmental, and neuroscience perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP [J]. *Sleep,* **25**: 120-138.

Pace-Schott EF, Hobson JA. 2002. The neurobiology of sleep: genetics,

cellular physiology and subcortical networks [J]. *Nat Rev Neurosci,* **3**: 591-605.

Pigeon WR, Hegel M, Unützer J, Fan MY, Sateia MJ, Lyness JM, Phillips C, Perlis ML, 2008. Is insomnia a perpetuating factor for late-life depression in the IMPACT cohort? [J]. *Sleep,* **31**: 481-488.

Postuma RB, Lang AE, Massicotte-Marquez J, Montplaisir J. 2006. Potential early markers of Parkinson disease in idiopathic REM sleep behavior disorder [J]. *Neurology,* **66**: 845-851.

Price DL, Martin LJ, Sisodia SS, Wagster MV, Koo EH, Walker LC, Koliatsos VE, Cork LC. 1991. Aged Non‑Human Primates: An Animal Model of Age‑Associated Neurodegenerative Disease [J]. *Brain Pathol,* **1**: 287-296.

Riemann D, Voderholzer U. 2003. Primary insomnia: a risk factor to develop depression? [J]. *J Affect Disord,* **76**: 255-259.

Sabo E, Reynolds CF. 1991. Sleep, depression, and suicide [J]. *Psychiatry Res,* **36**: 265-277.

Sakurai T, Mieda M, Tsujino N. 2010. The orexin system: roles in sleep/wake regulation [J]. *Ann N Y Acad Sci,* **1200**: 149-161.

Saper CB, Scammell TE, Lu J. 2005. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms [J]. *Nature,* **437**: 1257-1263.

Sawamura N, Ando T, Maruyama Y, Fujimuro M, Mochizuki H, Honjo K, Shimoda M, Toda H, Sawamura-Yamamoto T, Makuch LA. 2008. Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly [J]. *Mol Psychiatry,* **13**: 1138-1148.

Schenck CH, Bundlie SR, Mahowald MW. 1996. Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder [J]. *Neurology,* **46**: 388-393.

Sitaram N, Nurnberger Jr JI, Gershon ES, Gillin JC. 1982. Cholinergic regulation of mood and REM sleep: potential model and marker of vulnerability to affective disorder [J]. *Am J Psychiatry,* **139**: 571-576.

Tomppo L, Hennah W, Lahermo P, Loukola A, Tuulio-Henriksson A, Suvisaari J, Partonen T, Ekelund J, nnqvist L, Peltonen L. 2009. Association between genes of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) interactors and schizophrenia supports the role of the DISC1 pathway in the etiology of major mental illnesses [J]. *Biol Psychiatry,* **65**: 1055-1062.

Vazquez J, Baghdoyan HA. 2001. Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* **280**: 598-601.

Vitiello MV, Prinz PN, Williams DE, Frommlet MS, Ries RK. 1990. Sleep disturbances in patients with mild-stage Alzheimer's disease [J]. *J Gerontol*, **45**: 131-138.

Vollrath M, Wicki W, Angst J. 1989. The Zurich study. VIII. Insomnia: association with depression, anxiety, somatic syndromes, and course of insomnia [J]. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci,* **239**: 113-124.

Weitzman ED, Kripke DF, Pollak C, Dominguez J. 1965. Cyclic activity in sleep of Macaca mulatta [J]. *Arch Neurol,* **12**: 463-467.

Wulff K, Gatti S, Wettstein JG, Foster RG. 2010. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurosci,* **11**: 589-599.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 91−96
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01091

非人灵长类糖尿病动物模型研究进展



梁 斌*，吴晓云

(中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223)

摘要：糖尿病是继心血管疾病和肿瘤之后的另一种严重危害人类健康的重要慢性疾病，据世界卫生组织(WHO)报道，2009 年全世界约有 2.2 亿糖尿病患者。对糖尿病发病机理的研究、预防和诊断、治疗药物的筛选和评价都需要合适的动物模型。在已报道的糖尿病动物模型中，非人灵长类动物糖尿病病程、病症与人类的糖尿病最为相似。该文从糖尿病动物模型的来源归纳了目前报道的主要的非人灵长类糖尿病模型，重点介绍了猕猴、食蟹猴和树鼩糖尿病模型及其特征，并对该领域的发展提出了一些思考。

关键词：糖尿病；非人灵长类动物模型；猕猴；食蟹猴；树鼩
中图分类号：R-332; R587.1; Q959.848 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0091-06

Progress on nonhuman primate models of diabetes mellitus

LIANG Bin *, WU Xiao-Yun

（*Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Kunming Yunnan 650223, China*）

Abstract: Diabetes is the third most severely chronic disease after cardiovascular disease and cancer. World Health Organization (WHO) estimated 220 million diabetes patients worldwide in 2009. The rational animal models of diabetes are necessary for understanding the mechanisms of diabetes, diagnosis and prevention of diabetes as well as screen and evaluation of new drugs for diabetes treatment. Compared to other animal models of diabetes, the causes and symptoms of diabetes of nonhuman primates is more like human diabetes. We here reviewed the reported nonhuman primate models of diabetes based on the sources they were generated; especially focused on three models, *Macaca mullata, M. fascicularis, Tupaia belangeri*. Furthermore, we discussed the perspective development of nonhuman primate models of diabetes mellitus.

Key words: Diabetes; Animal models of nonhuman primates; *Macaca mullata; Macaca fascicularis; Tupaia belangeri*

糖尿病是一种严重危害人类健康的慢性疾病。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报道，2009 年全世界约有 2.2 亿糖尿病患者，2005 年有超过 110 万人死于糖尿病。预计 2030 年全世界糖尿病患者将达 3.6 亿(Wildet al, 2004)。我国糖尿病患病率已从 1980 年的 0.67%上升到 2004 年的 5.5%，增加了 9 倍 (Wu, 2006)。Yang et al(2010)报道，我国 20 岁以上人群总体糖尿病患病率已达 9.7%，糖尿病前期的患病率高达 15.5%，推算我国总糖尿病患者达 9 200 万以上，已超过印度成为世界上糖尿病第一大国。WHO 估计，2006—2015 年，糖尿病、心血管病、中风等会造成中国经济损失高达 5580 亿美元。

糖尿病是在遗传因素与环境因素长期共同作用下，由于胰岛素相对或绝对缺乏以及不同程度的抵抗所引起的一类代谢性疾病，其特点是血糖浓度不正常升高。糖尿病通常包括 1 型(Type 1 diabetes mellitus, T1DM)和 2 型(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)。一般认为，1 型糖尿病源于自身免疫系统的紊乱，即胰岛内分泌胰岛素的 β 细胞被体内免疫系统攻击而凋亡，导致胰岛素的缺乏，患者需要注射胰岛素，也称为胰岛素依赖型糖尿病

收稿日期：2010-11-23；接受日期：2010-12-31
基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-EW-R-12）资助；中国科学院基础前沿研究专项项目（KSCX2-EW-J-23）；中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室资助项目
*通讯作者(Corresponding author)，博士，研究员；E-mail: liangb@mail.kiz.ac.cn

(Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) 。2 型糖尿病则是一种典型的代谢紊乱，常常是出现胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)和胰岛 β 细胞功能失常引起的相对胰岛素不足。2 型糖尿病的病因非常复杂，主要是胰腺 β 细胞胰岛素分泌不足，以及肝脏、肌肉细胞和脂肪细胞不能有效地响应胰岛素而发挥正常功能，导致胰岛素抵抗(Lin & Sun, 2010)，但具体的致病机理至今尚不清楚。临床上，糖尿病患者表现高血糖，常常多尿、多饮、多食、体重下降(“三多一少”)。1 型糖尿病多发于青少年。1 型糖尿病患者起病较急(几周或者几个月)，病情重，常出现糖尿病酮症酸中毒。2 型糖尿病多见于中老年。2 型糖尿病患者食欲、精神体力正常、多体胖。体内胰岛素水平正常或偏高,但胰岛素的敏感性降低。2 型糖尿病患者发病程度比 1 型轻，早期几年无明显症状，较少发生酮症，但后期易出现心血管合并症、高血压、神经病变、糖尿病眼病、糖尿病肾病等。2 型糖尿病是糖尿病的最主要类型，占糖尿患者群的 90%以上。

研究糖尿病的发病机理、寻找早期预防和诊断手段、技术方法、研究治疗糖尿病药物的作用机制，以及糖尿病新药的筛选和评估都需要合适的糖尿病动物模型。目前，通过自发性、胰腺切除、食物诱导、化学物质诱导、遗传工程等多种方法成功地创建了大鼠、小鼠、羊、兔、犬、猴等糖尿病模型(Srinivasan & Ramarao, 2007)。但由于种属差异的关系，非灵长类糖尿病动物模型只能部分模拟人类糖尿病病症。非人灵长类动物由于和人类更加接近，其糖尿病模型能更好地模拟人类糖尿病的病理过程，有利于寻找更加有效的早期诊断和预防糖尿病的方法和技术手段，同时大大降低新药研发的风险。因而，非人灵长类糖尿病动物模型，受到广大生物医学研究者的重视和欢迎。非灵长类糖尿病动物模型已有很多综述，而非人灵长类糖尿病模型的综述很少。本文根据非人灵长类动物糖尿病模型的来源综述了目前已报道的主要非人灵长类糖尿病动物模型，分析、比较它们各自糖尿病的特征和优缺点。

1 自发性非人灵长类糖尿病模型

目前，已经报道的自发性非人灵长类糖尿病动物模型主要有松鼠猴(*Saimiri sciureus*)、食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、猕猴(*M. mulatta*)、苏拉维西猴(*M. nigra*)、树鼩(*Tupaia belangeri*)以及狒狒(*Papio hamadryas*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)(Jones, 1974)、台湾猕猴(*M. cyclopis*)(Howard & Palotay, 1975)、灰狒狒(*Mandrillus leucophaeus*)(Howard & Palotay, 1975)。这些自发性的糖尿病猴模型的血糖变化、病理特征等与人类 2 型糖尿病患者的临床症状相似，如自发性糖尿病多见于中老年肥胖猴子。它们的胰岛素水平下降，血糖浓度持续增高、糖耐量受损；甘油三酯增高，脂肪代谢紊乱；尿糖升高；最后出现酮症酸中毒；视网膜受损有眼病；胰腺细胞淀粉化等(Wagner et al, 2006)。

90%的人类 2 型糖尿病患者中具有胰岛细胞淀粉样沉积(Cefalu, 2006)。淀粉样小体对 β 细胞有毒性作用，能诱导 β 细胞的凋亡(Lorenzo et al, 1994)。胰岛细胞淀粉样变性既为导致 2 型糖尿病的一个病因(导致 β 细胞死亡)，也是 2 型糖尿病的结果(产生胰岛素抵抗)(Hoppener et al, 2002)。在报道的非人灵长类自发性 2 型糖尿病动物，如食蟹猴、猕猴、台湾猕猴、狒狒、灰狒狒、苏拉维西猴等胰岛细胞出现淀粉样沉积(Howard & Palotay, 1975; Palotay & Howard, 1982; Lorenzo et al, 1994; Ramarao & Kaul, 1999; Kim et al, 2005; Arslan et al, 2007)。

1.1 猕猴 (*Macaca mullata*)

猕猴属于旧大陆猴，分布于印度、孟加拉国、巴基斯坦、尼泊尔、缅甸、泰国、阿富汗、越南、中国南部地区等。猕猴被广泛用于生物医学研究，2000 年，猕猴 Tetra 成为第一个被克隆的非人灵长类动物，2001 年，获得了第一个转基因猕猴 ANDi。2007 年，猕猴的基因组完成测序(Pennisi, 2007a,b)，它与人类的基因组相似性高达 93%(Gibbs et al, 2007; Pennisi, 2007a)。

与人类 2 型糖尿病常见于中老年一样，大多数报道的猕猴自发性糖尿病发生在中老年猕猴上，如 Kim et al (2005)发现 15 只肥胖的老年猕猴有自发性的 2 型糖尿病。这些猕猴喂给实验室食物，多年后呈现肥胖，胰腺 β 细胞逐步受损，胰岛素水平下降，多年高血糖，最后发展为 2 型糖尿病，具高血糖和胰岛素抵抗症状。它们的视网膜多形核白细胞数目与糖尿病的发病程度正相关。另外，1 例自发性的 2 型糖尿病猕猴也是中老年、肥胖，具眼病，高血压、高脂、高胆固醇，低 HDL，部分失明(Johnson et al, 2005)。1 只 22 岁老龄雌性糖尿病猕猴周围视神经病变症状与人类糖尿病并发症状症状非常相似

(Cornblath et al,1989)。 Wang et al(2004)采用葡萄糖耐量试验和尿糖测试方法，从正常饲养的 100 只老龄猕猴群(8～11 岁)中筛选出了 3 只自发性糖尿病猕猴，其发病率与人类糖尿病发病率很类似； He et al (2006)在人工正常饲养的猕猴群中发现一只年龄为 10 岁，有类似人类糖尿病“三多一少”症状猴子。

1.2　食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

食蟹猴主要分布于东南亚地区，因为喜欢在退潮后到海边觅食螃蟹及贝类，故名食蟹猴。食蟹猴被广泛用于医学研究，如神经生物学和病毒学研究等。Jones (1974)报道，从 300 只饲喂高果糖食物的食蟹猴中发现 3 只 8 岁以上的食蟹后具有自发性糖尿病。与猕猴一样，自发性食蟹猴糖尿病症状类似人类的 2 型糖尿病症状 (Tanaka et al, 1986; Yasuda et al, 1988; Ishizaka et al, 2003; Wagner et al, 2010)；但 Bagdade et al (1995)报道，自发性糖尿病食蟹猴血糖很高，而脂类中除了甘油三酯较高外，其他，如 LDL、HDL 含量没有发生明显变化。

1.3　树鼩 (*Tupaia belangeri*)

树鼩外形像松鼠，生长于热带和亚热带地区。树鼩的分类地位尚未完全确定，但目前认为树鼩是灵长总目下的树鼩目(Scandentia)，属灵长类的近亲，本文把它暂时列入非人灵长类动物。由于其体型小(100～250 g)，孕期短，生长快、容易饲养、价廉、在生物进化史上更接近人类等优点，早在 20 世纪 70～80 年代就用于医学实验的研究。近几年来，树鼩作为人类疾病动物模型正受到广泛的重视，其线粒体基因组和低覆盖率(2X)基因组已有(Schmitz et al, 2000)。树鼩具有自发性糖尿病，这在 1966 年就被 Rabb et al (1966) 观察到。这些树鼩的表型如酮症、脱发、白内障等和人类糖尿病的表型一致；病理学检查显示胰腺小岛的 β 细胞缺失，被纤维细胞代替，这与人类糖尿病的发病机理类似。

2　链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)，即 2-甲基-2-(3-亚硝基脲)-D-吡喃糖，一种葡萄糖类似物，能够特异性损伤胰腺 β 细胞而被广泛地应用来创建糖尿病动物模型。STZ 致 β 细胞损伤的确切机制目前尚不清楚，STZ 可能通过胰腺 β 细胞中高表达的葡萄糖转运蛋白 2(GLU2)进入到胰腺细胞，引起 DNA 的烷基化，导致活性氧(ROS)产生和 NO 释放，DNA 最终导致胰腺细胞死亡，胰岛素合成减少，引发糖尿病(Szkudelski, 2001)。 STZ 造模稳定、快速，种属选择性不强、组织毒性相对较小等，因而 STZ 被广泛地应用来创建糖尿病动物模型。利用 STZ 建立了大鼠、豚鼠、小鼠、地鼠、兔、犬等非灵长类动物糖尿病和猕猴、食蟹猴、树鼩等非人灵长类糖尿病模型。STZ 在不同动物，甚至不同报道中诱导糖尿病所需要的剂量不尽相同。目前报道的 STZ 诱导的非人灵长类动物糖尿病为 1 型糖尿病，多用作胰腺细胞的异种移植受体。

2.1　猕　猴

最早 Mintz et al (1972)利用 STZ 诱导糖尿病猕猴，这些糖尿病猕猴出现多饮、多尿、多食和高血糖。Kemnitz et al (1985)等发现给猕猴注射 30～45 mg/kg STZ 能诱导糖尿病，并且怀孕前注射 STZ 会导致胎儿高血糖和高胰岛素、肺糖原浓度升高。Takimoto et al (1988) 也利用相似浓度的 STZ 静脉注射诱导出糖尿病猕猴。

由于 STZ 具有毒副作用，高剂量 STZ 很易导致造模动物死亡。STZ 诱导的糖尿病猕猴多年后会出现眼和肾的病变 (Jonasson et al, 1985; Tso et al, 1988; Buchi et al, 1996)。在 STZ 剂量和毒性方面，Shibata et al (2002)给成年猕猴注射 100、125、150 mg/kg STZ，发现 100 mg/kg STZ 不能诱导成年猕猴糖尿病；5 只用 150 mg/kg STZ 注射的猕猴发展为糖尿病。另外，2 只在 STZ 注射 7 h 后死亡，但死因不清。125 mg/kg STZ 成功造模，空腹时检测不到胰岛素水平。125 mg/kg 浓度的 STZ 没有导致猕猴死亡，视觉组织和肝组织没有损伤或者很小。

2.2　食蟹猴

Xu et al (2009)和 Theriault et a (1999)都报道给食蟹猴注射 STZ 可以成功诱导糖尿病。Litwak et al (1998b)给 8 只食蟹猴静脉注射 30 mg/kg STZ，诱导长期高血糖，研究食蟹猴长期 (6 个月)高血糖的影响。这 8 只 STZ 诱导的糖尿病猴中有 7 只需要胰岛素治疗来避免酮症酸中毒。与对照猴子相比，所有糖尿病猴子的餐前血糖和糖化血红蛋白值都明显上升，糖尿病猴子葡萄糖耐量试验反应异常，胰岛素含量下降。长期高血糖增加了 LDL 在血管沉积和动脉粥样硬化。Litwak et al (1998a) 认为增大的动脉粥样硬化可能是由于脂蛋白的改变或者是高血糖对动脉的直接影响。

Koulmanda et al (2003) 分析了不同剂量的 STZ

对食蟹猴的影响, 寻找能诱导糖尿病但毒害最小的STZ剂量。他们把24只食蟹猴分成两组, 第一组有4只, 注射100 mg/kg STZ; 第二组20只, 注射55 mg/kg STZ。两组动物注射STZ 24 h后都发展为糖尿病。高剂量STZ注射的动物几分钟内出现短暂呕吐, 第一周后, LFTs、尿素氮和肌酐升高。与此相反, 低剂量STZ注射的动物肝、肾功能正常。组织病理学分析表明, 高剂量STZ导致脏、肾小管损伤; 而低剂量STZ注射的动物肝、肾脏组织正常。Wu et al (2009) 认为低剂量的STZ (55mg/kg) 成功地诱导出最小的肝、肾毒性的食蟹猴糖尿病。他们还发现STZ诱导的年幼的糖尿病猕猴发育迟缓, 活动比正常对照多。

2.3 树 鼩

Ishiko et al (1997)和 Xian et al (2000)初步报道, 利用不同浓度的STZ可以诱导树鼩患糖尿病。我们的初步研究也表明, 多次小剂量STZ (60~80 mg/kg)和一次大剂量(90~120 mg/kg)能够导致树鼩糖尿病(结果尚未发表)。人类2型糖尿病患者和非人灵长类2型糖尿病动物的胰腺具有胰岛细胞淀粉样沉积, Wagner et al (2001) 证实, STZ诱导的糖尿病食蟹猴并没有淀粉样沉积症状, 但 Xian et al (2000) 用STZ诱导的糖尿病树鼩淀粉染色呈阳性, 是否是胰岛细胞淀粉样沉积需要进一步证实。

3 STZ和胰腺切除

由于STZ的毒副作用, Qiao et al (2009)和 Jin et al (2010)结合STZ和胰腺部分切除手术诱导猕猴糖尿病, 降低STZ的毒性, 提高糖尿病模型的稳定性。在Jin et al (2010) 研究中, 他们把13只猕猴分为两组, 一组有9只, 每3只猕猴分别注射80、100和120 mg/kg的STZ; 另外一组4只, 切除70%～75%的胰腺, 同时注射低剂量STZ (15 mg/kg)。这两组猕猴都发展为糖尿病, 第一组猴子中, 高剂量STZ处理后的猴子出现肝、肾损伤; 低剂量STZ (80 mg/kg)发病症状轻, 后期出现转阴。第二组中, 猕猴的肝肾生化指标正常, 并发症很轻。同样, Qiao et al (2009)等把4只猕猴分为两组, 一组2只, 第一组进行胰腺全部切除, 第二组进行75%胰腺切除, 然后给以小剂量STZ(15 mg/kg)。这些方法都能诱导1型糖尿病, 但部分胰腺切除加小剂量STZ诱导的糖尿病模型比全部胰腺切除或者高剂量诱导的糖尿病模型更稳、副作用更小。

4 食物诱导非人灵长类糖尿病模型

Wagner et al (2006)给45只食蟹猴饲喂高碳水化合物和低胆固醇的食物[18%蛋白、22%的脂肪、60%碳水化合物(果糖含量达20%)]。虽然大部分食蟹猴的空腹血糖值保持正常, 但糖耐量检测发现, 其血糖浓度和胰岛素含量在个体中的差别很大。那些具高胰岛素(Hyperinsulinemic, HI)的8只猴子或者糖耐量受损(impaired glucose tolerant, IGT)的10只猴子空腹血糖浓度和胰岛素含量显著地升高。同时具有高血糖和糖耐量受损的5只猴子(HI+IGT)出现肥胖, 体重比对照组猴子多40%, 这组猴子的廋素浓度也高。与正常食物饲喂的其他猴子相比, 所有上述猴子具高血脂和低HDLC, 其中HI+IGT组猴子的值最高。一年后, 10只IGT猴子中的1只和5只HI+IGT猴子中的3只发展为糖尿病。

5 小结和展望

在非灵长类动物中, 无论是自发性、STZ化合物诱导、基因突变、或者其他途径获得的糖尿病模型都有1型和2型糖尿病动物模型的报道。目前报道的STZ诱导、STZ+胰腺切除等途径获得的非人灵长类糖尿病模型为1型糖尿病。所选用动物主要是猕猴、食蟹猴和树鼩。这些模型对研究1型糖尿病的发病机理、治疗(如细胞移植)等提供了很好的糖尿病动物模型。但造模所用的STZ剂量即使在同一物种上，不同研究报道也不尽相同。高剂量STZ会引起造模动物死亡, 低剂量STZ难于成模, 或者成模后很快就转阴。另外, STZ注射方式(腹腔、静脉注射)等对造模也有一定影响。因此, 采用STZ造糖尿病动物模型时一定要选用适合的剂量和注射方式, 一方面降低STZ的毒副作用; 另一方面提高STZ成模的稳定性。

在已报道的非人灵长类动物中, 自发性或者高脂高糖食物诱导的糖尿病为2型糖尿病。自发性非人灵长类动物糖尿病在多种猴子上都发现, 其发病病程、症状无明显区别, 都非常类似于人类的2型糖尿病, 如多发生在中老年猴子上, 高血糖、胰岛素抵抗、胰腺细胞出现淀粉样沉积等。胰腺细胞淀粉样沉积只在人类、非人灵长类、猫的糖尿病中发现。因此, 自发性的非人灵长类糖尿病模型是研究人类2型糖尿病发病机理、寻找早期预防、诊断与治疗的方法和技术、进行糖尿病新药的筛选和评价

的最佳动物模型。然而，已有的研究往往只报道、描述了非人灵长类动物糖尿病病症，对发病机制未作深入研究。

由于 2 型糖尿病患者占糖尿病患者的 90%以上，预防和治疗 2 型糖尿病是首要任务。虽然自发性的非人灵长类动物糖尿病病症非常类似人类 2 型糖尿病，但自发性非人灵长类糖尿病动物非常难得，很难得以广泛应用。因此，我们必须寻求其他方法创建 2 型糖尿病非人灵长类动物模型。(1) 可以通过食物+STZ 创建 2 型糖尿病非人灵长类动物模型。Wagner et al (2006)初步报道了高脂高糖食物能诱导食蟹猴糖尿病。一方面，我们可以进一步改进食物配方，获得更加理想的糖尿病模型；另一方面，可以结合食物和 STZ 共同诱导，缩短造模周期，寻找更理想的糖尿病模型。先用高糖高脂食物饲喂猴子，佐于合适剂量的 STZ 处理；或者 STZ 处理在先，随后饲喂高糖高脂食物，最终获得理想的 2 型糖尿病非人灵长类动物模型。(2) 遗传工程。猕猴的基因组已被测序，国内外已获得了转基因猕猴(Niu et al，2010)。因此，未来，可以利用转基因技术，基因敲除糖尿病相关基因，获得 2 型糖尿病猕猴。(3) 树鼩 2 型糖尿病模型。猕猴、食蟹猴等非人灵长类动物不仅饲养成本高，而且受伦理等因素限制，很难得到广泛应用。因此，寻找新的、合适的小型低等非人灵长类动物是首选。树鼩作为灵长类动物的近亲或者低等灵长类动物，其体型小，成熟快，饲养成本低，可以快速建近交系、大规模饲养，是一种潜在的新型人类疾病动物模型。树鼩自发性糖尿病和人类糖尿病相似 (Rabb et al，1966)，而且 STZ 注射诱导的糖尿病树鼩的胰岛细胞呈阳性 (Xian et al，2000)。能否通过高脂高糖食物、多次小量 STZ 注射、高脂高糖食物+STZ 共同诱导、或者其他方法，如开展遗传工程等创建 2 型糖尿病树鼩模型，我们正在开展这方面的研究。如果可行的话，这不仅将推动我们对 2 型糖尿病发病机理的了解，寻找早期诊断和预防措施，而且可以开展糖尿病药物的筛选和评价，大大降低糖尿病新药的研发成本和风险，造福于人类糖尿病患者。

参考文献：

Arslan HH, Nisbet C, Guvenc T. 2007. Spontaneous amyloidosis and diabetes mellitus in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) [J]. *Bull Vet Inst Pulawy*, **51**: 655-659.

Bagdade JD, Wagner JD, Rudel LL, Clarkson TB. 1995. Accelerated cholesteryl ester transfer and altered lipoprotein composition in diabetic cynomolgus monkeys [J]. *J Lipid Res*, **36**: 759-766.

Buchi ER, Kurosawa A, Tso MO. 1996. Retinopathy in diabetic hypertensive monkeys: a pathologic study [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **234**: 388-398.

Cefalu WT. 2006. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition [J]. *ILAR J*, **47**: 186-198.

Cornblath DR, Dellon AL, MacKinnon SE. 1989. Spontaneous diabetes mellitus in a rhesus monkey: Neurophysiological studies [J]. *Muscle Nerve*, **12**: 233-235.

Rogers J, Katze, M G., Burmgarner R, Weinstock G M., Prüfer K. 2007. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome [J]. *Science*, **316**: 222-234.

He ZL, Zhao Y, Lu S, Tang Y, Wang JB, Pan XH, Liang CL. 2006. Analysis of hematology and serum biochemical indexes of the spontaneous diabetes in one case of macaque [J]. *Prog Vet Med,* **27** (6): 88-91. [和占龙, 赵远, 鲁帅尧, 唐永明, 王俊斌, 潘兴华, 梁崇礼. 1 例自发性糖尿病猕猴血液学及血液生化指标分析. 动物医学进展, **27**(6): 88-91.]

Hoppener JW, Nieuwenhuis MG, Vroom TM, Ahren B, Lips CJ. 2002. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **197**: 205-212.

Howard CF, Jr., Palotay JL 1975). Spontaneous diabetes mellitus in Macaca cyclopis and Mandrillus leucophaeus: case reports. [J]. *Lab Anim SCI,* **25**: 191-196.

Ishiko S, Yoshida A, Mori F, Abiko T, Kitaya N, Kojima M, Saito K. 1997. Early ocular changes in a tree shrew model of diabetes[J]. *J Jpn Ophthalmol Soc*, **101**: 19-23.

Ishizaka T, Sato T, Kato K, Ohba M, Kimotsuki T, Yasuda M. 2003. Subcutaneous continuous glucose monitoring and dose adjustment decreases glycosylated hemoglobin in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys[J]. *Contemp Top Lab Anim Sci*, **42**: 36-40.

Jin X, Zeng L, He SR, Chen YN, Tian BL, Mai G, Yang G, Wei LL, Zhang Y, Li HX, Wang L, Qiao CF, Cheng JQ, Lu YR. 2010.Comparison of single high-dose streptozotocin with partial pancreatectomy combined with low-dose streptozotocin for diabetes induction in rhesus monkeys [J]. *Exp Biol Med: Maywood,* **235**: 877-885.

Johnson MA, Lutty GA, McLeod DS, Otsuji T, Flower RW, Sandagar G, Alexander T, Steidl SM, Hansen BC.2005. Ocular structure and function in an aged monkey with spontaneous diabetes mellitus [J]. *Exp Eye Res,* **80**: 37-42.

Jonasson O, Jones CW, Bauman A, John E, Manaligod J, Tso MO. 1985. The pathophysiology of experimental insulin-deficient diabetes in the monkey. Implications for pancreatic transplantation [J]. *Ann Surg*, **201**: 27-39.

Jones SM 1974. Spontaneous diabetes in monkeys. [J]. *Lab Anim*, **8**: 161-166.

Kemnitz JW, Perelman RH, Engle MJ, Farrell PM. 1985. An experimental model for studies of fetal maldevelopment in the diabetic pregnancy [J]. *Pediatr Pulmonol*, 1 S79-85.

Kim SY, Johnson MA, McLeod DS, Alexander T, Hansen BC, Lutty GA. 2005. Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas [J]. *Diabet,* **54**: 1534-1542.

Koulmanda M, Qipo A, Chebrolu S, O'Neil J, Auchincloss H, Smith RN. 2003. The effect of low versus high dose of streptozotocin in cynomolgus

monkeys (*Macaca fascilularis*) [J]. *Am J Transplant*, **3**: 267-272.

Lin Y, Sun Z. 2010. Current views on type 2 diabetes [J]. *J Endocrinol*, **204**: 1-11.

Litwak KN, Cefalu WT, Wagner JD. 1998a. Chronic hyperglycemia increases arterial low-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in cynomolgus monkeys [J]. *Metabolism*, **47**: 947-954.

Litwak KN, Cefalu WT, Wagner JD. 1998b. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in cynomolgus monkeys: changes in carbohydrate metabolism, skin glycation, and pancreatic islets. [J]. *Lab Anim Sci*, **48**: 172-178.

Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. 1994. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus [J]. *Nature*, **368**: 756-760.

Mintz DH, Chez RA, Hutchinson DL. 1972. Subhuman primate pregnancy complicated by streptozotocin-induced diabetes mellitus. [J]. *J Clin Invest*, **51**: 837-847.

Niu YY, Yu Y, Bernat A, Yang SH, He XC, Guo XY, Chen DL, Chen YC, Ji SH, Si W, LüYG, Tan T, Wei Q, Wang H, Shi L, Guan J, Zhu XM, Afanassieff M, Savatier P, Zhang K, Zhou Q, Ji WZ. 2010. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 17663-17667.

Palotay JL, Howard CF, Jr. 1982. Insular amyloidosis in spontaneously diabetic nonhuman primates [J]. *Vet Pathol Suppl*, **7**: 81-192.

Pennisi E. 2007a. Boom time for monkey research. [J]. *Science*, **316**: 216-218.

Pennisi E. 2007b. Genomicists tackle the primate tree. [J]. *Science*, **316**: 218-221.

Qiao CF, Tian BL, Mai G, Wei LL, Jin X, Ren Y, Chen YN, Li HX, Li YP, Wang L, Cheng JQ, Lu YR. 2009. Induction of diabetes in rhesus monkeys and establishment of insulin administration strategy. [J]. *Transplant Proc*., **41**: 413-417.

Rabb GB, Getty RE, Williamson WM, Lombard LS.1966. Spontaneous diabetes mellitus in tree shrews, *Urogale everetti* [J]. *Diabetes*, **15**: 327-330.

Ramarao P, Kaul CL. 1999. Insulin resistance: current therapeutic approaches [J]. *Drugs Today:Barc*, **35**: 895-911.

Schmitz J, Ohme M, Zischler H. 2000. The complete mitochondrial genome of Tupaia belangeri and the phylogenetic affiliation of scandentia to other eutherian orders [J]. *Mol Biol Evol*, **17**: 1334-1343.

Shibata S, Kirchhof N, Matsumoto S, Sageshima J, Hiraoka K, Ansite J, Wistrom M, Sutherland DE, Hering BJ. 2002. High-dose streptozotocin for diabetes induction in adult rhesus monkeys [J]. *Transplant Proc*, **34**: 1341-1344.

Srinivasan K, Ramarao P. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview[J]. *Indian J Med Res*, **125**: 451-472.

Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas [J]. *Physiol Res*, **50**: 537-546.

Takimoto G, Jones C, Lands W, Bauman A, Jeffrey J, Jonasson O.1988. Biochemical changes in rhesus monkey during the first days after streptozotocin administration are indicative of selective β cell destruction [J]. *Metabolism*, **37**: 364-370.

Tanaka Y, Ohto H, Kohno M, Cho F, Honjo S. 1986. Spontaneous diabetes mellitus in cynomolgus monkeys (s)[J]. *Jikken Dobutsu*, **35**:11-19.

Theriault BR, Thistlethwaite JR, Jr., Levisetti MG, Wardrip CL, Szot G, Bruce DS, Rilo H, Li X, Gray GS, Bluestone JA, Padrid PA. 1999. Induction, maintenance, and reversal of streptozotocin-induced insulin-dependent diabetes mellitus in the juvenile cynomolgus monkey (*Macaca fascilularis*) [J]. *Transplantation*, **68**: 331-337.

Tso MO, Kurosawa A, Benhamou E, Bauman A, Jeffrey J, Jonasson O. 1988. Microangiopathic retinopathy in experimental diabetic monkeys[J]. *Trans Am Ophthalmol So,* **86**: 389-421.

Wagner JD, Cline JM, Shadoan MK, Bullock BC, Rankin SE, Cefalu WT. 2001. Naturally occurring and experimental diabetes in cynomolgus monkeys: a comparison of carbohydrate and lipid metabolism and islet pathology [J]. *Toxicol Pathol*, **29**: 142-148.

Wagner JD, Shadoan MK, Zhang L, Ward GM, Royer LJ, Kavanagh K, Francone OL, Auerbach BJ, Harwood HJ, Jr. 2010. A selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, CP-900691, improves plasma lipids, lipoproteins, and glycemic control in diabetic monkeys [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, **333**: 844-853.

Wagner JE, Kavanagh K, Ward GM, Auerbach BJ, Harwood HJ, Jr., Kaplan JR. 2006. Old world nonhuman primate models of type 2 diabetes mellitus. [J]. *ILAR J*, **47**: 259-271.

Wang Y, Ye H, Shaoo J. 2004. Discussion of rhesus monkey model of the spontaneous diabetes [J]. *Chn J Comp Med*, **14**(1): 13-15 [王艳静, 叶华虎, 邵军. 猕猴自发性糖尿病动物模型的初步探讨.中国比较医学杂志, **14**(1): 13-15.]

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, **27**: 1047-1053.

Wu D, Zou C, Yue F, Li X, Li S, Zhang YA. 2009. The effect of long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus (STZ-DM) on cynomolgus (Macaca fascicularis) monkeys [J]. *J Med Primatol*, **38**: 15-22.

Wu J. 2006.The mechanisms of development of type 2 diabetes mellitus. [J]. *Chn Bull Life Sci,* **18**(5): 411-413. [吴家睿. 2 型糖尿病发生发展的分子机制研究. 生命科学, **18**(5): 411-413.]

Xian S, Huang S, Su J, Qin Y, Ou C, Luo Z, Wei M. 2000. A study on experimental diabetes animal models in tree shrews induced by streptozotocin [J]. *J Guangxi Med Univ,* **17**(6): 945-948. [冼苏, 黄松, 苏建家, 秦映芬, 欧超, 罗佐杰, 韦敏怡.链脲佐菌素诱导树鼩糖尿病动物模型研究. 广西医科大学学报, **17**(6): 945-948.]

Xu C, Chen Y, Xu Z, Lu Q, Xu Q, Shen Y, Su J, Long Y. 2009. Establishment of Cynomolgus Monkey Diabetic Models [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chn Med,* **26**(1): 91-94. [徐传磊, 陈艳明,徐志勇, 卢起, 徐勤, 沈逸萍, 苏俊芳, 龙艳. 建立食蟹猴糖尿病模型的研究.广州中医药大学学报, 26(1): 91-94.]

Yang WY, Lu JM, Weng JP, Jia WJ, Ji LN, Xiao JH, Shan ZY, Liu J, Tian HM, Ji QH, Zhu DL, Ge JP, Lin LX, Chen L, Guo XH, Zhao ZG, Li QA, Zhou ZG, Shan GL, He JA. 2010. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, **362**: 1090-1101.

Yasuda M, Takaoka M, Fujiwara T, Mori M. 1988. Occurrence of spontaneous diabetes mellitus in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and impaired glucose tolerance in its descendants [J]. *J Med Primatol,* **17**: 319-332.

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 97−103 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01097

树鼩作为丙型肝炎动物模型的 HCV 受体研究进展

BACK

李 尧[1]，代解杰[2]，孙晓梅[2]，夏雪山[1,*]

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院，云南 昆明 650224; 2. 中国医学科学院/中国协和医科大学 昆明医学生物研究所，云南 昆明 650118)

摘要：丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)全球流行、危害严重，合适的小动物模型的缺乏严重阻碍了药物和疫苗的研发。该文介绍丙型肝炎危害与病毒复制特点，以 HCV 入胞受体为重点，通过比较现有丙型肝炎动物模型，从分子水平探讨树鼩作为丙型肝炎动物模型的可能性。

关键词：丙型肝炎；树鼩；动物模型；受体
中图分类号：R-332; R373.21; Q959.832 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2011)01-0097-07

Progress in studies on HCV receptor of *Tupaia* as a potential hepatitis C animal model

LI Yao[1], DAI Jie-Jie[2], SUN Xiao-Mei[2], XIA Xue-Shan[1,*]

(1. *Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan* 650224, *China*;
2. *Institute of Medical Biology*, *Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College*, *Kunming Yunnan* 650018, *China*)

Abstract: Hepatitis C virus is a prevalent and globally distributed human pathogen that seriously harmful to public health. However, the development of therapy and vaccine was impeded by the lack of suit small animal models. Herein, we introduce the characters of HCV replication. Taken the HCV cellular receptors as the viewpoint, the potentiality of tupaia as hepatitis C animal model is discussed at the molecular level by comparing of present animal model.

Key words: Hepatitis C; Tupaia; Animal model; Receptor

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)作为致非甲、非乙型肝炎的主要病原体(Choo et al, 1989)，到 1989 年才完成其全长基因组测序并正式命名。由于 HCV 基因组结构与黄病毒类似，核酸序列也有较高的同源性，将其分类为黄病毒科(Lindenbach & Rice, 2001)。已确定的 HCV 主要传播途径有血液传播和母婴传播，有研究报道，HCV 也可通过性行为传播，并可能存在其他不明传播途径。据 WHO 报道，全球有 1.7～2 亿 HCV 感染者，我国属 HCV 的中高度感染区，有 3800～4000 万人感染 HCV(Alter & Seeff, 2000)。HCV 一经感染，75%～85% 急性感染者发展为慢性丙型肝炎，慢性感染期无明显临床症状，经过 10～30 年的病程进展，约 5%的慢性丙型肝炎患者最终会发展为肝硬化和肝细胞癌(Shimotohno, 2000; Poynard et al, 2003)。由于疾病的全球性流行和高度慢性化致病过程，丙型肝炎已成为一严重危害人民健康的重大疾病。

目前，对丙型肝炎病毒最有效的治疗方法是干扰素与利巴韦林联合疗法，然而，该疗法对不同的基因型 HCV 感染者的治疗反应性差异很大，医疗费用高，并有部分用药者表现出明显的副作用，亟待研究更有效地治疗方法(Locamini & Bartholomeusz, 2002)。疫苗是保护易感者、控制病毒传播的最有效手段，但由于对 HCV 感染机制不清楚，尤其是合适小动物模型的缺乏，导致丙型肝炎疫苗研制受到严重制约(Bartenschlager & Lohmann, 2001)。

本综述围绕 HCV 感染肝细胞的关键分子——受体，从受体同源性及功能相似性的角度，探讨树

收稿日期：2010-12-03；接受日期：2011-01-20
基金项目：国家重点基础研究研究计划项目(2009CB522502)；国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BAI83B02)
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: oliverxia2000@yahoo.com.cn
第一作者简介：李尧(1986－)，男，硕士，主要研究方向：分子病毒学, E-mail: liyao420420@163.com

鼩作为丙型肝炎小动物模型的可能性。

1 HCV 复制与主要细胞受体

1.1 HCV 的感染与复制周期

HCV 为单股正链 RNA 病毒, 病毒颗粒直径小于 80 nm, 中心为致密核衣壳包裹的单股正链RNA, 核衣壳外包绕含脂质的囊膜, 囊膜上有刺突(Lindenbach & Rice, 2001), 是病毒与细胞膜表面受体结合的主要组分。病毒基因组全长约 9.6 kb, 5'端非翻译区(non-translated region, NTR)结构较为保守, 对 HCV 基因组起始复制作用重要。HCV 基因的开放读码框架被翻译为 3 010 个氨基酸的多聚蛋白前体(Choo et al, 1991), 在宿主和病毒编码蛋白酶的共同作用下, 生成 3 种结构蛋白(核心蛋白 C、包膜蛋白 E1 和 E2)和 6 种非结构蛋白(NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a 和 NS5b)(Bartenschlager & Sparacio, 2007)。结构蛋白是 HCV 的主要组成部分(Hassan et al, 2009), 非结构蛋白在 HCV 基因组复制过程中有着重要作用。HCV 基因组 3'端还有一个 27～55 nt 的非编码区(3'NTR), 对病毒基因组复制或翻译效率有重要调节作用(Suzuki et a1, 2007; Ebihara et al, 2008)。

目前, 对 HCV 的感染与复制机制尚不清楚, 但通过与 HCV 相近的其他黄病毒科的病毒感染机制比较分析, 可推测知道 HCV 复制周期的大致情况(Birke & FrancoisLoic, 2006)。认为 HCV 首先与肝细胞表面的特异性受体结合, 在肝细胞表面"抛锚"停下。然后, 肝细胞膜将病毒包裹起来, "吞"入细胞浆内。病毒进入肝细胞浆后, 其衣壳和囊膜被包裹它的肝细胞膜融合, 将其遗传物质 RNA 和非结构蛋白质释放到胞浆内。病毒 RNA 具备 mRNA 的所有功能, 利用宿主细胞的核糖体翻译合成前体蛋白, 前体蛋白经过剪切、加工, 产生各种结构蛋白与非结构蛋白。病毒 RAN 在自有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的催化下, 复制出多个互补的负链 RNA, 负链 RNA 又可作为合成更多正链 RNA 的模板。肝细胞浆内新合成的蛋白质和正链 RNA 一起, 自组装为病毒颗粒, 进入胞浆的空泡内, 并将空泡的膜覆盖与表面, 组装成完整的病毒颗粒。新组装成的病毒颗粒, 以"出芽"的方式, 从肝细胞释放出去(Denise et al, 2004; Bartenschlager & Lohmann, 2000)。丙型肝炎病毒就这样周而复始, 不断感染新的肝细胞, 产生更多的病毒。

1.2 HCV 主要受体

病毒通过囊膜蛋白与宿主细胞膜表面受体结合是病毒感染的第一步, 受体也被认为是决定病毒感染宿主特异性和组织特异性的主要因素。目前, 已经确定在 HCV 病毒感染细胞过程有介导功能的受体有 CD81、SR-BI、LDLr、Claudin-1、Occludin 等分子。

1.2.1 CD81 分子

CD81 基因组 DNA 由 8 个外显子和 7 个内含子组成, 全长为 1 500 bp, 位于人第 11 号染色体上。CD81 的 cDNA 含有惟一的开放读码框架, 编码 236 个氨基酸(Levy et al, 1998)。CD81 是一种非糖基化膜蛋白, 属于四次跨膜蛋白超家族(transmembrane-4 superfamily, TM4SF), 由 4 个跨膜区、2 个胞外区和 2 个胞浆内末端组成。CD81 的两个膜外区是 HCV 病毒囊膜蛋白结合的主要位点, 其中胞外小环有 28 个氨基酸残基, 序列高度保守; 胞外大环(LEL)有 80 个氨基酸残基, 物种间差异较大。胞外大环中的高变区 EC2 也是 HCV 膜蛋白 E2 结合的位点(Higginbottom et a1, 2000), 主要体现 CD81 感染的种属特异性。有报道发现, 胞外小环的含有 4 个保守半胱氨酸形成的 2 个二硫键, 还原条件所引起二硫键就被破坏, 可导致 CD81 分子丧失与 HCV 囊膜结合的能力。因此, Tseng et a1 (2001)认为胞外小环对 CD81 正常结构的维持和功能的发挥也是必需的。

最早, 由于发现分泌表达的 HCV E2 可以与细胞表面蛋白 CD81 相结合, 从而推断 CD81 可能是 HCV 受体(Piled et a1, 1998)。在此启示下, Meola et a1(2000)对 CD81 在 HCV 的入胞过程中的作用进行了实验验证: 将 CD81 表达载体转入 HepG2 细胞, 使其获得了对 HCVpp 的易感性, CD81 抗体可阻断至少 90%的 HCVpp 感染, CD81 特异性 siRNA 使 CD81 表达下调 70%情况下, HCVpp 感染被阻断。病毒与 CD81 结合, 主要通过 E2 糖蛋白的关键位点(420～535 位)实现, 糖基化情况及正常蛋白结构是影响结合的主要因素(Tan et a1, 2003; Chen & He, 2003)。

1.2.2 SR-BI 受体

SR-BI 受体又称 B 类 I 型清道夫受体, 其基因组位于人 l2 号染色体上, 长度约为 7.5 kb, 编码 509 个氨基酸组成的细胞表面糖蛋白, 其相对分子质量约为 54 k, 包括 2 个短胞质域、2 个跨膜区以 1 个膜外区(Kapadia et a1, 2007; Connelly & Williams,

2004)。Scarselli et al (2002)发现不同基因型 HCV 的 E2 蛋白均能够与不表达 CD81 的 HepG2 细胞结合，说明除 CD81 外还有其他分子可介导 HCV 感染细胞。进而，用免疫沉淀及 Western blot 法发现可与 HCV 特异结合的 SR-BI 分子。同时，表达 SR-BI 的 CHO 细胞也能够被 E2 结合，并进一步证实 SR-BI 在 HCV 感染过程中可能起重要作用。Grove et a1 (2007)研究发现，HVR1 抗体和 SR-BI 对 E2 的高度可变区 1 (HVR1)的竞争性结合表明，SR-BI 和与 HCV 的主要结合位点在囊膜蛋白 2 的高变区 1 (HVR1)。

SR-BI 是一多配体受体，可与包括 HDL、LDL、VLDL 在内的多种脂蛋白结合，并且还可与 β 淀粉状蛋白和马来酰牛血清蛋白结合(Varban et al, 1998)。LDL 通过与 SR-BI 结合，完成受体介导的细胞内吞作用，最终进入细胞为溶酶体所降解。SR-BI 可选择性地摄取 HDL 中的脂质并且把无脂质 HDL 释放入细胞外，此一转脂过程也增强了 HCV 的入侵作用。SR-BI 与多种脂蛋白的结合和介导入胞，提示 SR-BI 也能够介导脂蛋白相关结合物进入细胞，可能参与 HCV 与易感细胞的黏附及入胞。

Bartosch & Cosset (2006)研究发现，CD81 和 SR-BI 的同时存是 HCVpp 感染肝细胞的必要条件，但同时表达 CD81 和 SR-BI 的非肝源性细胞不能被 HCVpp 感染，提示 HCV 感染肝细胞可能需要 CD81、SR-BI 及某些肝特异性因子的共同参与。

1.2.3　LDLr

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLr)，是一种细胞表面糖蛋白，其相对分子质量为 115 k, LDLr 前体由 860 个氨基酸残基组成，经过加工后的 LDLr 具有 839 个氨基酸，整个蛋白质结构可分为 5 个区域：配体结合结构域、EGF 前体结构域、含糖基结构域、跨膜结构域、胞浆结构域(Molina et a1, 2007; Wünschmann et a1, 2006)。

对于 LDLr 的促进 HCV 感染细胞的机制，目前尚不明确，但初步认为细胞膜上的 LDLr 主要结合 LDL，间接介导 HCV 感染细胞(Andréo et a1, 2007)。HCV 首先与血浆中低密度脂蛋白结合，利用它们与靶细胞表面的 LDLr 相互作用进入细胞(Wünschmann et a1, 2006)。LDLr 的抗体以及载脂蛋白 B 抗体能抑制 HCV 对细胞的入侵，进一步说明 LDLr 在 HCV 的感染机制中起到至关重要的作用，但 LDLr 对 HCV 感染的介导作用需要 CD81 和 SR-BI 的协助完成 (Monazahian et a1, 2000)。

1.2.4　Claudin-1 受体

Claudin 属于一个多基因家族，目前已发现 20 种 Claudin 成员，是相对分子质量为 22～27 k 的跨膜蛋白。该蛋白由 4 个疏水的跨膜区、2 个胞外环和 3 个包内区域组成。Claudin 蛋白的胞外环对于细胞间紧密连接条带形成和细胞对离子通透的选择性具有重要作用。Claudin-l 是 Claudin 家族成员之一，表达于所有上皮细胞中，在肝脏细胞的表达量最高(Evans et a1, 2007)。研究证实，Claudin-l 是 HCV 入胞所需的必要蛋白质，HCV 先通过特定的受体结合于肝细胞上，然后与 Claudin-l 蛋白结合，利用细胞的内吞作用进入细胞内。尽管对 Claudin-l 介导 HCV 感染的细节还不清楚，但 Claudin-l 受体被敲除，会导致细胞对 HCV 的易感性大大降低。研究进一步发现，Claudin-l 在 HCV 与 CD81 结合后，对病毒入胞过程起到明显的促进作用，Claudin-l 可能参与 HCV 的免疫逃逸(Evans et a1, 2007; Blackard et al, 2006)。

1.2.5　Occludin 受体

跨膜蛋白 Occludin 是 2009 年新发现的可介导 HCV 入胞的紧密连接蛋白受体，其相对分子质量约为 60 k，含有 4 个跨膜区。由于是新发现的受体，对该受体认识还处于初期，只知道 Occludin 会与 HCV 的 E2 作用，在 HCV 和 CD81 等其它受体结合后协同介导 HCV 入胞(Alexander et a1, 2004; Thomas, 2009)。

目前，我们对 HCV 细胞受体及其介导病毒感染机制的了解并不透彻，同时，HCV 的入胞过程并不是某一个受体所能完成的，而是多种受体及其复合物共同完成。但是，已有受体在 HCV 入胞过程中都起到一定作用，不同物种 HCV 受体同源性的研究对发现、开发新的丙型肝炎动物模型具有重要意义。

2　丙型肝炎的动物模型

自从 HCV 的发现之初，缺乏有效的 HCV 体外培养体系和合适的动物模型，一直阻碍着对 HCV 研究的深入。Wakita et al (2005)获得急性丙型肝炎患者 HCV 全序列，建立了 HCV 全基因组复制子系统，实现了 HCV 体外培养，并可高效产生感染性病毒颗粒。美国 Rice 和 Chisari 的两个研究组在特定的细胞系中获得全序列 HCV 基因组的表达及感染

性 HCV 颗粒, HCV 的体外培养问题得到根本性解决 (Lindenbach et al, 2005; Zhong et al, 2005)。合适小动物模型的发现与建立, 成为 HCV 研究中迫切需要解决的问题。

理想的 HCV 动物模型的建立, 不仅有利于丙型肝炎疫苗的研究, 同时对深入研究丙型肝炎的慢性化致病机制, 包括研究病毒变异特性与宿主免疫应答规律等, 具有重要意义。除人和黑猩猩是 HCV 的自然宿主外, 至今尚未发现其他自然动物对 HCV 易感(Lanford et al, 1994)。现在可用于 HCV 感染的动物模型包括：黑猩猩、猴、树鼩、转基因鼠以及人鼠嵌合肝模型等(Carloni et al, 1993)。

2.1 黑猩猩

黑猩猩(Chimpanzee*, Pan troglodytes*)是目前发现除人以外 HCV 的惟一自然感染动物。HCV 在黑猩猩体内引起的免疫应答与人的极为相似, HCV 可以在黑猩猩体内复制, 复制效率与在人体内非常相似, 但黑猩猩对 HCV 的免疫选择性压力较低。因此, 造成的可检测到的 HCV 基因变异也较少(Bassett et al, 1999)。HCV 感染黑猩猩后, 会出现自限性感染的暂时性病毒血症、间歇性病毒血症和持续性病毒血症三种情况。目前有关 HCV 病毒的感染与复制特性、致病机制等相关领域获得的重大突破, 大多以黑猩猩为模型完成 (Ray et al, 2000; Larsson et al, 2004), 但由于全球黑猩猩资源匮乏, 研究费用昂贵。另外, 由于黑猩猩为人类“近亲”的道德伦理问题, 黑猩猩作为丙型肝炎动物模型的应用受到严重限制。

2.2 猴类

与人类亲源关系相近的另外一种灵长类动物——猴类, 在艾滋病等其他人类病毒性疾病研究的应用较为广泛, 但有关猴类作为 HCV 的动物模型的研究报道并不多见。主要原因在于 HCV 对不同种类猴子感染的稳定性差, 感染后致病效果和临床症状不明显, 猴能否成为 HCV 的动物模型还有待考证, 在猴体内植入人肝细胞及对猴进行基因工程改造, 是建立猴丙型肝炎动物模型的有效途径(Xia et al, 1995，1996)。

2.3 人工改造的小鼠模型

小鼠作为生物实验的成熟的动物模型, 广泛应用于各种研究。有研究者也将小鼠模型应用于丙型肝炎研究, 但由于鼠的 SR-BI、CD81、CLDN1 等关键受体分子的基因序列与蛋白结构与人类有明显差异, 尤其鼠的 CD81 分子胞外大环第 182、184、186 及 196 位的氨基酸等与 E2 结合的关键位点, 与人完全不同, 导致 HCV 囊膜蛋白与鼠肝细胞的结合力大大下降, HCV 对自然小鼠基本无感染性 (Meuleman et al, 2005; Ploss & Rice, 2009)。随着现代生物技术的发展, 人们可通过各种技术手段改造小鼠, 使之具有与人相同的肝脏组织环境, 可用于 HCV 的研究。丙型肝炎小鼠动物模型主要有转基因小鼠和肝移植小鼠, 前者是将 HCV 的基因片段转至小鼠, 使其在小鼠体内表达, 从而得到转基因小鼠, 如 HCV 三聚体小鼠(Meuleman et al, 2005); 后者人肝细胞的移植到免疫缺陷小鼠, 使之拥有人的肝环境和免疫系统, 如白蛋白-尿激酶型纤溶酶原激活物/严重合并的免疫缺陷疾病(Alb-uPA/SCID)小鼠、人肝嵌合体小鼠。尽管这些类型小鼠建模所用方法不同, 但目的都是一样的, 让小鼠的肝组织和免疫系统能模拟人的肝环境, 使其对 HCV 易感 (Chang et al, 2006), 但由于鼠与人之间的较大物种差异性, 体内环境及病理机制差异的固然存在, 导致鼠要作为丙型肝炎的动物模型的使用范围受到较大限制。

2.4 树鼩作为丙型肝炎模型的可能性

树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)是形似松鼠的小型哺乳动物, 主要分布于亚洲东南部的热带和亚热带地区, 我国的云南、广西、广东和海南等地都广泛分布。树鼩体型小, 生长繁殖快, 易于捕捉、驯养和繁殖, 成本低, 其新陈代谢和大体解剖比啮齿类动物更接近人类。树鼩成为研究人类相关疾病的动物模型, 广泛应用于病毒、神经、心理、糖尿病、脑缺血、血管、肿瘤、寄生虫等方面的研究。Wang et al (1997)用 HCV-RNA 阳性人血清静脉接种成年树鼩, 出现间歇性病毒血症, ALT 水平升高及人类相似的肝组织病变现象, 提示树鼩可成为 HCV 易感动物。Xie et al (1998, 2000)用不同亚型 HCV 感染正常和经过辐射的树鼩, 结果发现辐射的树鼩出现的明显病毒血症, 34.8%的被感染树鼩(8/23)血清中可检出 HCV RNA, 部分阳性树鼩均有不同程度的谷丙转氨酶异常升高和肝组织病理性炎症反应, 表明树鼩可感染 HCV, 有可能成为丙型肝炎小动物模型。Zhao et al (2002)对树鼩感染 HCV 后病毒准种分析显示, 树鼩肝细胞可被特定的准种选择性感染, 传代感染后肝细胞可检出新的准种。Amako et al (2010), 用 HCV 临床病毒株和培养体系

产生的 HCV 感染树鼩，发现树鼩不但能被 HCV 感染，而且感染后得到的第二代血清仍具有感染性，感染树鼩产生明显的肝组织病变。

我们研究组在建立 HCV 体外培养体系(J6/JFH-1)的基础上，获得大量高滴度的培养病毒上清，用于感染体外培养的树鼩的原代肝细胞和树鼩活体，发现被感染树鼩原代肝细胞可产生对 Huh7 细胞具有感染力的病毒颗粒，近 30%的接种树鼩出现间歇性的病毒血症和轻度肝脏组织病理变化。这些都是进一步证明了 HCV 能感染树鼩，树鼩具有成为丙型肝炎的动物模型的可能性；但是由于树鼩个体背景复杂等原因，导致受试树鼩对 HCV 感染情况不一致、不稳定，需要从树鼩品种选育、实验动物化，以及树鼩适应 HCV 病毒选择等不同角度开展工作，以建立丙型肝炎树鼩动物模型。

3　树鼩的主要 HCV 受体研究

作为可能的丙型肝炎动物模型，树鼩主要 HCV 受体的基因扩增、序列测定及同源关系分析，这些基因的表达以及其对 HCV 介导感染功能的确定，对建立树鼩丙型肝炎动物模型，解释 HCV 对树鼩的感染机制，具有重要的佐证作用。我们从树鼩肝组织提取 RNA，扩增树鼩 CD81、SR-BI、Claudin-1 和 Occludin 等主要 HCV 受体 cDNA，序列同源关系分析发现这些分子与人相应分析的核酸序列具有较高同源性。最新研究发现，将这些分子在对 HCV 不感染细胞系中表达，可介导 HCV 包膜糖蛋白假病毒颗粒(HCVpp)和体外培养体系产生 HCV 病毒(HCVcc)对细胞的感染。

3.1　树鼩的 CD81 受体

人的 CD81 可以被 HCV 囊膜蛋白有效结合，胞外大环(LEL)是结合的关键区域，该区具有 4 个关键位点：CD81 LEL 的第 162、182、184 和 186 位点氨基酸，直接关系到 E2 和 CD81 的紧密结合(Higginbottom et al, 2000)。研究表明，树鼩与人 CD81 分子的氨基酸序列同源性高达 96%, LEL 的氨基酸序列同源性也有 93%，4 个关键氨基酸位点上树鼩和人的 CD81 受体完全相同，尽管 CD81 LEL 上也有 6 个氨基酸树鼩不同于人，但这 6 个位点并非 HCV 囊膜蛋白结合的关键位点(Zhao et al, 2002; David et al, 2004)。与之比较，非洲绿猴在关键的 186 位氨基酸发生点突变，明显减少了与 HCV 囊膜蛋白的结合能力。用重组表达的可溶性 HCV 囊膜蛋白 E2 与细胞相互作用研究发现，其与树鼩的肝细胞结合作用与人源肝细胞相当，远高于鼠源肝细胞。我们将树鼩 CD81 分子的 cDNA 转染至 HepG2 细胞，发现树鼩 CD81 分子可有效介导 HCVpp 进入 HepG2 细胞，其介导作用甚至高于人的 CD81 分子。抗体阻断实验发现，人 CD81 单克隆抗体与兔抗人 CD81 多抗可以抑制，但不能完全阻断 HCVpp 感染树鼩 CD81 的 HepG2 细胞，预示除 CD81 外，树鼩肝细胞上还存在其他受体参与 HCV 的感染和 E2 的结合 (Zhao et al, 2002; Tong et al, 2010)。

3.2　树鼩 SR-BI 受体

SR-BI 是 HCV 进入宿主肝细胞的另一重要的糖蛋白受体，树鼩 SR-BI 受体与人的氨基酸同源性为 88%，胞外环同源性为 82%。Barth et al (2005)将树鼩 SR-BI 基因转染至 CHO 细胞，使其可与 HCV E2 蛋白结合，并证实 HVR1 区是病毒与树鼩受体结合的关键部位。用抗树鼩 SR-BI 抗体处理体外培养原代肝细胞，其对 HCV 的感染性大大降低。Tong et al (2010)利用慢病毒载体将树鼩 SR-BI 分子转染至 CHO 细胞，使其获得对 HCVpp 和 HCVcc 的感染性，此种感染可以被经 DNA 免疫获得的 SR-BI 单抗的部分阻断。然而，以上抗体处理不能完全阻断 HCVpp 对细胞的感染，说明树鼩原代肝细胞上除 SR-BI 之外，还有其他受体分子介导 HCVpp 的进入。

3.3　树鼩 Claudin-1 受体

尽管紧密连接蛋白 Claudin-1 至今仍是需要进一步验证的 HCV 受体，但由于其作为介导 HCV 入胞的多受体组合的重要一员，已受到广泛关注。我们扩增、克隆得到树鼩 Claudin-1 分子 cDNA，经序列测定与分析发现，树鼩和人之间该分子的氨基酸序列的同源性高达 93%。人和树鼩 Claudin-1 的胞外环氨基酸序列胞外环只有 3 个位点的差异，在认为是 HCV 感染的关键位点(I32 和 E48)，树鼩和人完全一样(Zhao et al, 2002)。Tong et al (2010)利用慢病毒载体将 Claudin-1 转入 293T 细胞表达，使其获得对 HCVpp 的易感性，初步证实树鼩 Claudin-1 分子可以支持 HCV 的感染。

3.4　树鼩的 Occludin 受体

我们扩增、克隆得到树鼩 Occludin 受体，序列分析发现树鼩和人该受体的氨基酸序列同源性高达 88%。HCV 结合关键区域(第二膜外区，EL2)的氨基酸序列同源性达到 91%，45 个位点中只有 4 个位点不同。与之比较，鼠和人的 EL2 区同源性只有

86%, 有 6 个位点发生突变。将树鼩 Occludin 分子与人的 CD81、SR-BI、Claudin-1 分子共转染的 NIH3T3 细胞, 可以被 HCVpp 感染。用树鼩 Occludin 分子的 EL2 替换人该分子的 EL2, 这个嵌合型 Occludin 分子同样可介导 HCVpp 进入 NIH3T3 细胞, 表明树鼩 Occludin 分子对 HCV 介导进入细胞作用与人的 Occludin 分子无明显差别(Tong et al, 2010)。

4 展 望

从分子水平上来看, 树鼩的现有 HCV 受体与人的同源性较高, 尤其介导 HCV 入胞的功能区段的关键氨基酸位点与人基本抑制, 功能验证发现树鼩这些受体可成功介导 HCV 的感染与入胞, 为树鼩有可能开发成为丙型肝炎小动物模型提供了良好佐证。我们也证实了 HCV 病毒对树鼩的原代肝细胞的感染性, 动物活体病毒感染实验初步证实树鼩可被体外培养大量获得的 HCV 感染。然而, 动物总体感染率较低, 尚不足于建立可满足研究需要的动物模型, 有待通过动物辅助生殖、易感家系选育与实验动物化、动物免疫致弱、适应性病毒筛选等不同学科领域研究工作的联合攻关, 以最终建立丙型肝炎树鼩动物模型。

参考文献:

Alexander DM, Bourke PD, Sheridan P, Konstandatos O, Wright JJ. 2004. Intrinsic connections in tree shrew V1 imply a global to local mapping [J]. *Vision Res,* **44**(9): 857-876.

Alter HJ, Seeff LB. 2000. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on the long-term outcome [J]. *Semin Liv Dis*, **20**(1): 17-25.

Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. 2010. Pathogenesis of hepatitis C Virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. *J Virol*, **84**(1): 303-311.

Andréo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, Marcellin P, Budkowska A. 2007. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection [J]. *Cell Microbiol*, **9**(10): 2445-2456.

Bartenschlager R, Lohmann V. 2000. Replication of hepatitis C virus [J]. *J Gen Virol*, **81**(7): 1631-1648.

Bartenschlager R, Lohmann V. 2001. Novel cell culture system for the hepatitis C virus [J]. *Antiviral Res*, **52**(1): 1-17.

Bartenschlager R, Sparacio S. 2007. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity *in vivo* and in cell culture [J]. *Virus Res*, **127**(2): 195-207.

Barth H, Cerino R, Arcuri M, Hoffmann M, Schürmann P, Adah MI, Gissler B, Zhao X, Ghisetti V, Lavezzo B, Blum HE, von Weizscker F, Vitelli A, Scarselli E, Baumert TF. 2005. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes [J]. *J Virol,* **79**(9): 5774-5785.

Bartosch B, Cosset FL. 2006. Cell entry of hepatitis C virus cell entry of hepatitis C virus [J]. *Virology*, **348**(1): 1-12.

Bassett SE, Thomas DL, Brasky KM, Lanford RE. 1999. Viral persistence stablity in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees [J]. *J Virol*, **73**(2): 1118-1126.

Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. 2006. Extrahepatic replication of HCV: Insights into clinical manifestations and biological consequences [J]. *Hepato1ogy*, **44**(1): 15-22.

Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, Battaglia M. 1993. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection [J]. *Arch Virol Suppl*, **8**: 31-39.

Chang KS, Cai ZH, Zhang C, Sen GC, Williams BR, Luo GX. 2006. replication of hepatitis c virus (HCV) RNA in mouse embryonic fibroblasts: protein kinase R (pKR)-dependent and pKR-independent mechanisms for controlling HCV RNA replication and mediating interferon activities [J]. *J Virol*, **80**(15): 7364-7374.

Chen RL, He YW. 2003. Relationship of CD81 and E2 envelope glycopretein with HCV-infectious host cells [J]. *World J Infect Vol*, 2003, **6**(3): 3-6. [陈瑞烈, 贺永文. 2003. CD81 及 E2 包膜糖蛋白与 HCV 感染宿主细胞的关系. 世界感染杂志, **6**(3): 3-6.]

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [J]. *Science*, **244** (4902): 359-362.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**(6): 2451-2455.

Connelly MA, Williams DL. 2004. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids [J]. *Curr Opin Lipidol*, **15**(3): 287-295.

Ebihara T, Matsumoto M, Seya T. 2008. HCV and innate immunity [J]. *Uirusu*, **58**(1): 19-26.

Evans MJ, von Hahn T, Tseheme DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus coreceptor required for a late step in entry [J]. *Nature*, **446**(7137): 801-805.

Grove J, Huby T, Stamataki Z, Vanwolleghem T, Meuleman P, Farquhar M, Schwarz A, Moreau M, Owen JS, Leroux-Roels G, Balfe P, McKeating JA. 2007. Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity [J]. *J Virol*, **81**(7): 3162-3169.

Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-kader O. 2009. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways [J]. *Hepatology*, **49**(5): 1469-1482.

Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. 2000. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 [J]. *J Virol*, **74**(8): 3642-3649.

Kapadia SB, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV. 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I [J]. *J Virol*, **81**(1): 374-383.

Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. 1994. Demonstration of *in vitro* in fection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specitic RT-PCR [J]. *Virol*, **202**(2): 606-620.

Larsson M, Babcock E,Grakoui A,Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N. 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in

dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus [J]. *J Virol*, **78**(12): 6151-6161.

Levy S, Todd SC, Maecker HT. 1998. CD81(TAPA-1):a molecule involved in signal traneduction and cell adhesion in the immune system [J]. *Annu Rev lmmunol*, **16**: 89-109.

Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitits C virus in cell culture[J]. *Science*, **309** (5734): 623-626.

Lindenbach BD, Rice CM. 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication [J]. *Fields Virol*, **1**(3): 991-1041.

Locamini SA, Bartholomeusz A. 2002. Advances in hepatitis C: What is coming in the next 5 years? [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**(4): 442-447.

Meola A, Sbardellati A, Bruni Ercole B, Cerretani M, Pezzanera M, Ceccacci A, Vitelli A, Levy S, Nicosia A, Traboni C, McKeating J, Scarselli E. 2000. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD8 1 does not correlate with species permissiveness to infection [J]. *J Virol*, **74**(13): 5933-5938.

Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hemptinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, Roskams T, Leroux-roels G. 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a UPA-SCID mouse chimera [J]. *Hepatology*, **41**(4): 847–856.

Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P. 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus [J]. *J Hepatol*, **46**(3): 411-419.

Monazahian M, Kippenberger S, Muller A, Seitz H, Bohme I, Grethe S, Thomssen R. 2000. Binding of human lipoproteins(low, very low, high density lipoproteins)to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus [J]. *Med Microblol Immunol*: Ber1, **188**(4): 177-184.

Ploss A, Rice CM. 2009. Towards a small animal model for hepatitis C [J]. *EMBO reports*, **10**(11): 1220-1227.

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. 2003. Viral hepatitis C [J]. *Lancet*, **362**(9401): 2095-2100.

Ray SC, Mao Q, Lanford RE, Bassett S, Laeyendecker O, Wang YM, Thomas DL. 2000. Hypervariable region 1 sequence stability during hepatitis C virus replication in chimpanzees [J]. *J Virol*, **74**(7): 3058-3066.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus [J]. *EMBO J*, **21**(19): 5017-5025.

Shimotohno K. 2000. Hepatitis C virus and its pathogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, **10**(3): 233-240.

Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. 2007. Molecular biology of hepatitis C virus [J]. *J Gastroenterol*, **42**(6): 411-423.

Tan YJ, Lim SP, Ng P, Goh PY, Lim SG, Tan YH, Hong W. 2003. CD81 engineered with endoeytotic signals mediates HCV cell entry: implications for receptor usage by HCV *in vivo* [J]. *Virology*, **308**(2): 250-269.

Tong Y, Zhu Y, Liu Y, Feng Y, Hua X, Chen Z, Ding H, Gao L, Wang Y, Feitelson MA, Xia X, Zhao P, Qi Z. 2010. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection[J]. *J Virol*, **10**(1128): 01818-10.

Tseng CT, Miskovsky E, Klimpel GR. 2001. Crosslinking CD81 results in activation of TCRgammadelta T cells [J]. *Cell Immunol*, **207**(1): 19-27.

Varban ML, Rinninger F, Wang N, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Gosselin ML, Dixon KL, Deeds JD, Acton SL, Tall AR, Huszar D. 1998. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high densitylipoprotoin cholesterol [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(8): 4619-4624.

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome[J]. *Nat Med*, **11**(7): 791-796.

Wang HP, Zhou YX, Yao ZQ, Hong S, Li GY. 1997. preliminary study of HCV infected Adult tree shrews [J]. *J Fourth Mili Med Univ*, **18**(4): 375-376. [王海平, 周永兴, 姚志强, 洪沙, 李光玉. 1997. 成年树鼩实验感染 HCV 的初步研究. 第四军医大学学报, **18(4)**: 375-376.]

Wünschmann S, Müller HM, Stipp CS, Hemler M. 2006. *In vitro* interaction between hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins(LPs)results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs [J]. *J InLet Dis*, **194**(8): 1058-1067.

Xia NS, Bi SL, Yang YP, Zhao TX, Jin DY, Ji WZ, Hong N, Tian BP, Tang Q, Liu M, Xie DS, Zhan MY. 1995. Preliminary results of 3 macaques infecting with China strains hepatitis c virus [J]. *Sci Chn*: Series B, **25**(7): 732-739.[夏宁邵, 毕胜利, 杨永平, 赵同兴, 金冬雁, 季维智, 洪宁, 田保平, 汤权, 刘敏, 谢德胜, 詹美云. 1995.中国株 HCV 实验感染 3 种猕猴的初步结果. 中国科学. B 辑, **25**(7): 732-739.]

Xia NS, Wang HL, Bi SL, Hong L, Tian BP, Zheng YS, Ji WZ, Hou YD. 1996. Analysis of 5'NTR - area C genome's CDNA sequence in China strains hepatitis c virus infection to macaques [J]. *Chn J Virol.* **12**(2): 111-117[夏宁邵, 王海林, 毕胜利, 洪宁, 田保平, 郑延硕, 刘敏, 季维智, 侯云德. 1996. 中国 HCV 感染猕猴后 5`NTR-C 区基因组的 CDNA 序列分析. 病毒学报, **12**(2): 111-117.]

Xie ZC, Gao WZ, Su HJ, Wu ZB, Xu GC, Ignacio J, Boj R, Prieto J. 2000. Tree shrews susceptibility to hepatitis c virus [J]. *J Guangxi Med Univ*, **17**(3): 347-350. [谢志春, 高伟志, 苏洁寒, 邬质彬, 徐国城, Ignacio J, Boj R, Prieto J. 2000. 树鼩对 HCV 的易感性研究. 广西医科大学学报, **17**(3): 347-350.]

Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews [J]. *Virology*, **244**(2): 513-520.

Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. 2002. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. *J Clin Inverst*, **109**(2): 221-232.

Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*[J]. *Proe Natl Acad Sci USA*, **102**(26): 9294-9299.

动 物 学 研 究 2011, Feb. 32(1): 104−108
Zoological Research

CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01104

乙型肝炎病毒树鼩体内慢性感染模型的研究历程和展望

BACK

李 瑗[*], 苏建家, 杨 春, 曹 骥, 欧 超, 梁 亮, 杨 芳, 王 琦

(广西肿瘤防治研究所 实验研究部 病理研究室，广西 南宁 530021)

摘要：乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球和我国的重要健康问题, 建立方便有效的 HBV 感染动物体内模型是开展 HBV 相关基础和临床研究的重要前提。 该实验室地处乙型肝炎和肝癌高发流行的广西地区, 自建立以来一直以肝癌的病因、发病机制和化学预防作为主要研究方向, 于 20 世纪 80 年代初开始树鼩体内感染 HBV 模型方面的研究并持续至今。该文对此研究历程作一概述, 并重点介绍关于用新生树鼩慢性感染 HBV 的新进展。

关键词：树鼩; 动物模型; 乙型肝炎病毒

中图分类号：Q95-33; R373; Q959.832 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0104-05

Progress on establishment of tree shrew (*Tupaia*) chronic infection with HBV *in vivo*

LI Yuan [*], SU Jian-Jia, YANG Chun, CAO Ji, OU Chao, LIANG Liang, YANG Fang, WANG Qi

(*Department of Experimental Pathology*, *Guangxi Cancer Institute*, *Nanning* 530021, *China*)

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the important health problems worldwide, especially in China. Feasible and effective animal models of HBV infection *in vivo* are prerequisite for the HBV-related basic and clinical studies. Located in the highly prevalent region of HBV and hepatocellular carcinoma (HCC), the laboratory of Guangxi Cancer Institute has focused on the cause, pathogenesis and chemoprevention of HCC, and has started the work of establishing tree shrew (*Tupaia*) models of HBV infection *in vivo* since the early 1980s. This paper provides an overview of the research process, and highlights the new progress on the chronic infection of tree shrews after inoculated with HBV neonatally *in vivo*.

Key words: Tree shrew (*Tupaia*); Animal model; Hepatitis B virus

1 建立乙型肝炎病毒树鼩体内慢性感染模型的背景和意义

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性的健康问题。我国是 HBV 感染高发流行区, 约有 7 亿人曾经感染 HBV, 其中慢性感染人数高达 1.2 亿, 占全球 HBV 感染总数的 1/3 左右。15%～35%的慢性乙型肝炎患者因肝硬化、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 肝癌)等终末期肝病而死亡。

肝癌是世界和我国常见并且预后凶险的恶性肿瘤, 在世界和我国全部恶性肿瘤死因中均位列第三。全世界 2007 年肝癌死亡例数为 68 万人, 其中 80%以上发生在发展中国家, 这其中 55%以上发生在我国(Thun et al, 2010)。我国肝癌发病率在过去 30 年一直呈上升趋势, 增长幅度高达约 250%, 仅次于肺癌(Zhao et al, 2010)。尽管已知 HBV 感染是我国肝癌的最主要病因, 但 HBV 慢性感染机制至今未能清楚阐明, 肝癌的发生机制及其防治方面的研究几十年来亦未获得突破性进展。

自 20 世纪 80 年代以来, 世界一些地区和我国先后开始的大规模新生儿乙型肝炎疫苗免疫接种计划已经显现出对降低儿童感染 HBV 和发生肝癌的作用, 表明其不失为一高性价比的肝癌预防策略

收稿日期：2010-11-29; 接受日期：2011-01-30

[*]通讯作者(Corresponding author), E-mail: liyuangx@yahoo.com.cn

(Lim et al, 2009；Zhou et al, 2009)，但我国原已有的庞大 HBV 感染人群以及由于 HBV 在治疗或预防免疫过程中发生突变导致免疫无效(Clements et al, 2010)而产生的新的 HBV 感染人群，仍处于发生慢性肝病的高风险之中。因此，HBV 感染仍是我国当前和今后相当长时期内严重危害人民健康，需要优先解决的一个重大问题(Zhuang, 2009)。

缺乏合适的体内外感染 HBV 实验模型是阻碍 HBV 相关的基础和临床研究的主要瓶颈，其根本原因在于 HBV 属嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae)，感染宿主的种属范围狭小、特异性严格，即各病毒只能感染一种和极少数其他相关物种。嗜肝 DNA 病毒科分为哺乳类(mammalian)和禽类(avian)两个属，前者包括人、毛猴、土拨鼠和地松鼠的嗜肝 DNA 病毒 HBV、WMHBV、WHV 和 GSHV；后者包括鸭和苍鹭的嗜肝 DNA 病毒 DHBV 和 HHBV。HBV 是嗜肝 DNA 病毒的原型，在基因组结构的相似性和基因序列的同源性等方面与本家族其他成员有程度不同的差别。多年来，土拨鼠感染 WHV 模型和鸭感染 DHBV 模型在探索 HBV 感染人体的机制和研发临床用药等方面做出了很大的贡献，但将这两个动物模型的相关研究结果用于阐释人类感染 HBV 的相关事件，均尚存很明显的屏障。而黑猩猩感染 HBV 模型虽然已经得到公认，但因其为濒危珍稀大型动物而不适用于普通实验研究。因此，建立方便有效的、与人类有较近亲缘关系的动物感染人 HBV 模型，是研究 HBV 的生物学特性、感染致病机理及有效防治措施所亟需。

2　树鼩体内感染 HBV 模型的研究初始与进程

树鼩(*Tupaia*, tree shrew)属灵长目原猴亚目树鼩科，也有学者认为属灵长目与食虫目之间的独立阶元——攀鼩目，含不同的亚科、亚属和亚种，在我国主要分布于云南、广西等西南部省区。树鼩与人类在生理生化、代谢、基因组学等方面的相似性远高于大鼠、小鼠、土拨鼠等常用啮齿类实验动物(Novacek et al, 1992；Springer et al, 2003)，并具有个体小，便于实验操作、价廉易获得、能感染多种与人类疾病有关的病毒等显著特点。世界卫生组织(WHO)多年前就呼吁用树鼩代替大型灵长类动物进行科学实验，我国也于近年将树鼩资源的开发利用、标准化及建立人类疾病模型提到议事日程(Jiao et al, 2009)，并列入国家“十一五”科技支撑计划。

本实验室最早关于树鼩感染 HBV 的研究见于严瑞琪、苏建家等人于 20 世纪 80 年代的报道(Yan et al, 1984；Su et al, 1987)。该研究以人 HBV 感染者血清为感染源，分别两次经静脉和腹腔接种于树鼩(0.5 mL/次)，接种后定期采血作 HBV 感染相关的血清免疫学检测、斑点杂交法检测 HBV DNA、生化检测转氨酶(ALT)、电镜观察 HBV 颗粒，部分动物的肝活检组织作免疫组化检测 HBsAg 和 HBcAg、原位分子杂交检测 HBV DNA。经过接种后 137 周的实验观察，结果显示 87/96 只(90.63%)树鼩血清和（或）肝组织出现 HBV 感染标志物，电镜下血清可查见 Dane 氏颗粒及 HBsAg 颗粒，Southern blot 检测肝组织可见复制型及整合型 HBV DNA。这些结果首次在国内外表明，树鼩可以感染人 HBV，可以建立体内感染 HBV 动物模型。 随后，应用树鼩进行实验诱发肝癌的研究结果显示，17 只喂食黄曲霉毒素 B1(AFB1)并且感染 HBV、 24 只单纯喂 AFB1 和 9 只单纯感染 HBV 的树鼩，在 158 周的实验观察期内分别有 9 例(52.9%)、3 例(12.5%)和 1 例(11.1%)发生 HCC，表明 HBV 和 AFB1 在肝癌发生中具有协同作用，并从动物实验角度支持了 HBV 与 HCC 存在病因学关系的观点(Yan et al, 1987)。

在以上研究基础上，随着本实验室在树鼩的饲养、保定、抽血、麻醉和肝活检等动物实验技术的不断建立和提高(Ban et al, 1998a)，树鼩可以经受反复多次的抽血和剖腹肝活检手术，使观察其在实验诱发肝癌形成过程中的各时期血和肝组织的动态变化成为可能。在随后十余年期间，本实验室对 HBV 感染树鼩及其与 AFB1 在树鼩肝癌发生中的病因作用(Su et al, 1992；Li et al, 2000a)、发病机制(Ban et al, 1998b；Qin et al 1998；Li et al, 1999)和化学预防(Li et al, 2000b；Cao et al, 2005)等方面进行了系列研究，这些研究结果不仅显示了树鼩在建立乙型肝炎和肝癌等人类疾病模型方面的作用，也为这些人类疾病的相关基础研究做出了贡献。

国内外其他关于树鼩体内感染 HBV 模型的研究主要见于：Pang et al (1981)报道，野生成年树鼩经肌肉接种人 HBV 感染血清后，动物血清中不仅可测到 HBsAg，还可在电镜下观察到大量的直径为 22 nm 的 HBsAg 颗粒；Li et al (1995)报道，用野生成年树鼩在感染 HBV 的基础上重叠感染丁型肝炎病毒(HDV，其感染需要嗜肝 DNA 病毒的帮助)获得

初步成功；Walter et al (1996)报道，用新生和成年树鼩接种人 HBV 后，观察大约 20 周，新生期接种的树鼩的表现类似于人类的急性自限性肝炎；而成年期接种的树鼩的仅表现为一过性感染。

然而，由于以上研究所用的树鼩多为野外捕获，年龄、遗传和健康背景不详，个体差异大，同时可能由于一些早期的实验研究在检测 HBV 感染标志物方面所用的 ELISA、免疫组化、原位杂交等方法或其试剂的特异性、敏感性不稳定，使某些检测结果的重复性不理想，致使一些学者对树鼩能否感染 HBV 提出质疑(Wang et al, 1996；Wang, 1998)。

3 优化 HBV 树鼩体内感染模型的探索

近十年来，本实验室一方面在应用树鼩进行肝癌病因和发病机制的基础研究中，通过新兴的高通量基因组学和蛋白质组学技术，对部分树鼩基因进行测序、制作基因芯片和进行肝癌相关基因的检测(Chen et al, 2005)，以及对树鼩肝癌发生过程中的关键基因和蛋白进行筛选和鉴定等研究(Qin et al, 2006；Li et al, 2008a,b)；另一方面，由于国内外开展树鼩感染 HBV 方面的研究虽已历时 20 余年，但树鼩体内能否长期感染 HBV 仍存在争议，树鼩模型还不能有效地应用于 HBV 相关研究。 为此，本实验室在优化树鼩体内慢性感染 HBV 模型方面也开展了一系列探索。

首先，基于人类的 HBV 慢性感染者主要源于围生期或幼年期被感染这一现象，即婴幼儿感染 HBV 后有很高的慢性化率；而大部分成年人感染 HBV 后病毒很快被清除，以及德国 Freiburg 大学 Blum 教授研究小组关于新生期树鼩感染 HBV 的效果优于成年树鼩的初步报道(Walter et al, 1996)，我们推测应用免疫系统尚未发育完善的围生期和幼年树鼩接种人 HBV 可能提高感染效率。

为此，本实验室借鉴在国际合作研究中探索到的人工繁育树鼩的经验(Li et al, 2001)，先在本实验室建立了树鼩的人工繁殖和育幼的基本方法和条件(Liang et al, 2005)，随后开展了用人工繁育的围生期(出生前后各 1 周)和幼年(1—3 月龄)树鼩感染人 HBV 的探讨。该探讨主要以巢式 PCR(nPCR)对实验树鼩的血和肝组织 HBV DNA 进行检测，初步结果提示，用围生期和幼年树鼩接种人 HBV 可以提高感染效率(Liang et al, 2006)。

其次，在此基础上，本实验室进一步对新生期接种 HBV 的树鼩体内的 HBV 感染标志物用多种检测方法进行长期动态观测，结果显示，树鼩血和肝组织中 HBV DNA 和 HBsAg 可持续阳性至接种后 48 周以上，并且 Southern blot 和 nPCR 检测到肝组织中 HBV cccDNA 等标志物，表明新生树鼩接种人 HBV 后，病毒能够在其体内长期存在和稳定复制(Yang et al, 2009)。

最近，为了进一步优化树鼩感染 HBV 模型，本实验室对各种可能影响树鼩感染 HBV 效率的因素，如不同的感染源、接种方式、检测方法和多种辅助措施，进行了较全面的探讨。该研究对 77 只新生树鼩和 49 只非新生(出生后 1 月至 1 年)树鼩用不同感染源、接种方式和辅助措施处理后，用多种检测方法对动物血和肝组织的 HBV 感染标志进行动态观察。结果显示，6 只新生期接种的树鼩确证为 HBV 慢性感染——其肝组织保持高拷贝的 HBV DNA 和血清保持高滴度的 HBsAg 长达接种后 72 周以上(最长达 228 周)，并且肝组织经 dot blot 检测 HBV DNA、免疫组织化学法检测 HBsAg 和 HBcAg 均显示阳性；另外，还有 7 只新生期接种的树鼩暂定为可疑慢性感染——其肝组织 HBV DNA 和血清 HBsAg 长期表现为间歇性低水平阳性；而 49 只非新生期接种的树鼩无一明确显示为慢性感染。该研究结果的主要意义有以下几方面：第一，再次证实树鼩能够感染 HBV 并成为 HBV 长期携带者，新生期接种 HBV 的树鼩感染效果优于非新生期接种；第二，在 6 只确认为持续感染和 7 只可疑为持续感染的新生期接种的树鼩中，分别有 1 只和 2 只是用同一只确证为慢性感染的树鼩血清接种的，表明树鼩间可以传代感染 HBV；第三，该研究在动物接种年龄、感染源、接种方式、辅助措施等方面筛选出一些影响树鼩感染 HBV 效率的因素，一定程度上实现了对树鼩体内感染 HBV 模型的优化，有利于今后工作的进一步开展。以上这些最新研究结果的相关论文正在整理中。

4 国内外现状和展望

前述的国内早年关于树鼩体内感染 HBV 的研究少见后续报道；而德国 Freiburg 大学 Blum 教授实验室自 1996 年报道用新生和成年树鼩体内感染 HBV 以及用树鼩的原代肝细胞体外感染 HBV 的系列研究结果(Walter et al, 1996)后，虽然仍一直开展树鼩感染肝炎病毒的相关研究，但主要转为用树鼩

肝细胞体外感染HBV或丙型肝炎病毒(HCV)，未见再有体内感染 HBV 的相关报道。

本研究室在树鼩体内慢性感染 HBV 方面的研究持续多年，虽然，最近关于确证树鼩能够慢性感染 HBV 的研究结果令人鼓舞，但还须在提高动物感染率和体内病毒载量，以及诱发动物出现类似人长期感染 HBV 后出现的慢性肝炎、肝硬化、肝癌等慢性肝病方面努力。在这一方面，我们认为对不同的树鼩种系、不同的 HBV 基因型/亚型和准种、不同的接种用血清的处理方法以及不同的免疫抑制药的应用等因素值得进一步探索。此外，本实验室最近的研究结果显示，一些树鼩于接种 HBV 后，肝组织长期保持低拷贝数的 HBV DNA，但血清 HBsAg 却为阴性，这些动物是否类似于人类的"隐匿性感染"非常值得进一步观察和验证，因国内外已有研究显示隐匿性感染 HBV 的人群仍有传染下一代和自身发生肝癌或其他慢性肝病的危险性。

综上所述，树鼩体内外感染 HBV 的研究受到较多的关注，但开展相关研究，尤其是持续性研究的不多。因此，这一领域虽然多年来不断有所进展，但与建成理想的人类感染 HBV 动物模型仍有一定差距。而由于 HBV 和近年来日益受到重视的 HCV 感染及其相关的肝癌在我国和全球形势严峻，树鼩在人类疾病模型中的作用近年来在国内外得到较多关注，树鼩肝细胞的分离、培养等一些与肝炎病毒感染模型相关的基础研究近年在我国已有陆续报道。相信通过各相关领域的合力，理想的树鼩体内感染 HBV 和 HCV 模型将在肝癌、病毒性肝炎相关的基础和临床研究中发挥重要作用。

致谢：衷心感谢本系列研究的创始和奠基人严瑞琪教授，参与本系列研究前期或部分工作的陈志英、覃国忠、覃柳亮、班克臣、段小娴、岳惠芬等同事，参与本系列研究部分工作的张晶晶、杨光、翟丹梅等研究生，以及长期参与本系列动物实验的工人和众多在动物实验中给予帮助的研究生。感谢对本系列研究给予国家"八五"和"九五"攻关项目、国家自然科学基金项目(6 项)、广西科技厅项目(8 项)和广西卫生厅项目(3 项)资助的有关单位。

。

参考文献：

Ban KC, Su JJ, Yang C, Huang GH, Luo XL, Qin LL, Duan XX. 1998a. Techniques of tree shrew liver biopsy, anesthesia and blood collection [J]. *Shanghai Lab Anim Sci*, **18**(1):29-30. [班克臣, 苏建家, 杨春, 黄国华, 罗小玲, 覃柳亮, 段小娴. 1998. 树鼩肝活检及麻醉和抽血技术. 上海实验动物科学, **18**(1):29-30.]

Bank KC, SU JJ, Yang C, Huang GH, Qi LL, Li Y, Luo XL, Duan XX, Yan RQ. 1998b Relationship between the expression of P21 and human hepatitis B virus and aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma in tree shrews [J]. *Chn J Oncol*, **20** (2): 111. [班克臣, 苏建家, 杨春, 黄国华, 覃柳亮, 李瑗, 罗小玲, 段小娴, 严瑞琪. 1998. 人乙型肝炎病毒与黄曲霉毒素B1诱发树鼩肝癌过程中肝组织P21表达与肝癌发生的关系. 中华肿瘤杂志, **20**(2):111.]

Cao J, Li Y, Zhang LS, Su JJ, Ou C, Yang C, Ban KC, Duan XX, Yue HF, Wei W, Ou SJ. 2005. Effect of tea polyphenal on chemopreventing hepatocellular carcinoma of tree shrew [J]. *Tumor*, **25**(2):118-121. [曹骥, 李瑗, 张丽生, 苏建家, 欧超, 杨春, 班克臣, 段小娴, 岳惠芬, 韦薇, 欧胜敬. 2005. 茶多酚在树鼩肝癌形成中的化学预防作用. 肿瘤 **25**(2):118-121.]

Chen YN, Cao J, Su JJ, Li Y. 2005. A cDNA microarray study of the differential expression of genes in signal transduction pathway during hepatocarcinogenesis in tree shrews [J]. *Chn J Hepatol*, **13**(10):763-767. [陈远能, 曹骥, 苏建家, 李瑗. 2005. 用树鼩 cDNA 芯片研究树鼩肝癌中参与信号传导的部分基因变化情况. 中华肝脏病杂志, **13**(10):763-767.]

Clements CJ, Coghlan B, Creati M, Locarnini S, Tedder RS, Torresi J. 2010. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization?[J] *Bull World Health Organ*, **88**(1):66-73.

Jiao JL, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Zheng H, Shen PQ. 2009. The development and use of tree shrew resource and its standards research - the strategic discussion for laboratory animal resource development in china [J]. *Chn J Comp Med*, **19**(7):73-78. [角建林, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 郑红, 沈培清. 2009. 树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨. 中国比较医学杂志, **19**(7):73-78.]

Li QF, Ding MQ, Wang H, Mao Q, Wu CQ, Zheng H, Gu CM, Wang YM. 1995. The infection of hepatitis D virus in adult Tupaia [J]. *Nat Med J Chn*, **75** (10): 611-613. [李奇芬, 丁明权, 王洪, 毛青, 吴纯清, 郑红, 顾长海, 王宇明. 1995. 树鼩感染丁型肝炎病毒的实验研究. 中华医学杂志, **75** (10): 611-613.]

Li Y, Su JJ, Yan, RQ, Qin LL, Yang C, Ban KC, Duan XX, Huang GH. 1999. Expression of insulin-like growth factor (IGF-II) protein during tree shrews' hepatocarcinogenesis differently induced by AFB1 and/or HBV [J]. *J Guangxi Med Univ*, **16**(4): 395-398. [李瑗, 苏建家, 严瑞琪, 覃柳亮, 杨春, 班克臣, 段小娴, 黄国华. 1999. HBV 和 AFB1 引起树鼩肝癌形成过程中 IGF-II 蛋白表达的动态观察. 广西医科大学学报. **16**(4):395-398.]

Li Y, Su JJ, Qin LL, Yang C, Ban KC, Luo D, Huang GH. Ou C, Yan RQ,

Wang HY. 2000 a . Serial pathologic changes in liver of tree shrew during hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B and aflatoxin B1 [J]. *Chn J Clin Exp Pathol*, **16**(3): 224-227. [李瑗, 苏建家, 覃柳亮, 杨春, 班克臣, 罗丹, 黄国华, 欧超, 严瑞琪, 王辉云. 2000. 乙肝病毒和 AFB1 诱发树鼩肝癌的病理变化. 临床与实验病理学杂志, **16**(3):224-227.]

Li Y, Su JJ, Qin LL, Egner PA, Wang JS, Groopman JD, Kensler TW, Roebuck BD. 2000b. Reduction of aflatoxin B(1) adduct biomarkers by oltipraz in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Cancer Lett*. 2000, **154**(1):79-83.

Li Y, Baumgartner K, MacMillan D, Roebuck BD. 2001. Hand rearing of tree shrews [J]. *Chn J Zool*, **36**(3):32-36. [李瑗, Baumgartner K, MacMillan D, Roebuck BD. 2001. 树鼩实验种群的繁育. 动物学杂志, **36**(3):32-36.]

Li Y, Qin X, Cui J, Dai Z, Kang XN, Yue HY, Zhang Y, Su JJ, Cao J, Ou C, Yang C, Duan XX, Yue HF, Liu YK. 2008a. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II [J]. *Proteomics*. **8**(7):1490-1501.

Li Y, Wan DF, Wei W, Su JJ, Cao J, Qiu QK, Ou C, Ban KC , Yang C, Yue HF. 2008b. Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri chinesis*) [J]. *Hepatol Res*, **8**(1):85-95.

Liang L, Li Y, Yang C, Su JJ, Duan XX, Cao J, Ou C, Band KC, Yue HF. 2005. Breeding of tree shrews in laboratory [J]. *Sichuan J Zool*, **24**(2):199-201. [梁亮, 李瑗, 杨春, 苏建家, 段小娴, 曹骥, 欧超, 班克臣, 岳惠芬. 2005. 树鼩实验室繁殖及育幼的探讨. 四川动物, **24**(2):199-201.]

Liang L, Li Y, Yang C, Cao J, Su JJ, Chen MW, Ban KC, Ou C, Duan XX, Yue HF. 2006. Perinatal and young tree shrews infected with human hepatitis B virus [J]. *Chn J Zoon*, **22**(8): 792-795. [梁亮, 李瑗, 杨春, 曹骥, 苏建家, 陈茂伟, 班克臣, 欧超, 段小娴, 岳惠芬. 2006. 用人工繁育的围生期和幼年树鼩感染人乙型肝炎病毒的初步研究. 中国人兽共患病学报, **22**(8):792-795.]

Lim SG, Mohammed R, Yuen MF, Kao JH. 2009. Prevention of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, **24**(8):1352-1357.

Novacek MJ. 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree [J]. *Nature*, **356**(6365):121-125.

Pang QF, Wan XB, Xu AY, Wang ZM, Wang GX, Zhu BY, Zhang XS. 1981. Hepatitis B virus (HBV) infection in the experimental tree shrews (Abstract) [J]. *J Med Res*, **9**:11-12.. [庞其方, 万新邦, 胥爱源, 王祖铭, 王桂香, 朱宝友, 张新生. 1981. 乙型肝炎病毒(HBV)感染树鼩的实验研究(摘要). 医学研究杂志, **9**:11-12.]

Qin LL, SU JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yan RQ. 1998. Expression of insulin-like growth factor II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in Tupaia [J]. *Chn J Hepatol*, **6**(3):155-157. [覃柳亮, 苏建家, 李瑗, 杨春, 班克臣, 严瑞琪. 1998. HBV 与 AFB1 诱发树鼩肝癌前病变过程中癌基因的表达. 中华肝脏病杂志, **6**(3):155-157.]

Qin X, Dai Z, Cui JF, Su JJ, Cao J, Ou C, Li S, Chen XY, Xie L, Wang J, Yue HY, Li Y, Liu YK. 2006. Differentially expressed proteomics during hepatocarcinogenesis of tree shrew induced by aflatoxin B1 [J]. *Chn J Lab Med*, **29**(6):538-542. [秦雪, 代智, 崔杰峰, 苏建家, 曹骥, 欧超, 李山, 陈晓燕, 谢丽, 王健, 岳海英, 李瑗, 刘银坤. 2006. 黄曲霉毒素 Bl 诱发树鼩肝癌过程中的差异表达蛋白质分析及意义. 中华检验医学杂志, **29**(6):538-542.]

Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ. 2003. Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**(3):1056-1061.

Su JJ, Yan RQ, Gan YQ, Zhou DN, Huang DR, Huang GH. 1987. Adult tree shrews experimentally infected with hepatitis B virus [J]. *Chn J Pathol* **16**(2):103-105. [苏建家, 严瑞琪, 甘友全, 周德南, 黄定瑞, 黄国华. 1987. 成年树鼩实验感染乙型肝炎病毒的研究. 中华病理学杂志, **16**(2):103-105.]

Su JJ, Wang Y, Yang C, Huang DR, Hiroaki O, Yan RQ.1992. Human HBV DNA can integrate into the liver cell gene of tree shrew [J]. *Chn J Pathol*, **21**(5):308-309. [苏建家, 王宇, 杨春, 黄定瑞, 冈本宏明, 严瑞琪.1992. 人 HBV DNA 能整合入树鼩肝细胞基因. 中华病理学杂志, **21**(5):308-309.]

Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. 2010. The global burden of cancer: priorities for prevention [J]. *Carcinogenesis*, **31**(1):100-110.

Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatology*, **24**(1):1-5.

Wang FS, Chen NS, Wang Y, Liu Y, Du SS, Feng BF. 1996. Non-specific reaction in the study of Tupaia animal model inoculated with HBV-rich humans sera [J]. *J Beijing Med Univ*, **28**(5):340-342. [王凤水, 陈红松, 王宇, 刘艳, 杜绍时, 冯百芳. 1996. 树鼩感人乙肝病毒动物模型研究中的非特异性反应. 北京医科大学学报, **28**(5):340-342.]

Wang HP, Yao ZQ, Zhou YX, Hong S, Li GY. 1998. Evaluation of experimental infection by human hepatitis B virus in adult tree shrews [J]. *Chn J Hepatol*, **6**(2):96-97. [王海平, 姚志强, 周永兴, 洪沙, 李光玉. 1998. 树鼩实验感染乙型肝炎病毒的再评价. 中华肝脏病杂志, **6**(2):96-97.]

Yan RQ, Su JJ, Chen ZY, Liu YG, Gan YQ, Zhou DN. 1984. A preliminary study on experimental infection of human hepatitis B virus in adult tree shrews [J]. *J Guangxi Med Univ*, **1**(1):10-15. [严瑞琪, 苏建家, 陈志英, 刘由庚, 甘有全, 周德南. 1984. 人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼩的初步研究. 广西医学院学报, **1**(1):10-15.]

Yang F, Cao J, Zhang JJ, Wang Q, Su JJ, Yang C, Ou C, Shi JL, Wang DP, Li Y. 2009. Long-term observation of hepatitis B virus (HBV) replication in new-born tree shrews inoculated with HBV [J]. *Chn J Hepatol*, **17**(8): 580-584. [杨芳, 曹骥, 张晶晶, 王琦, 苏建家, 杨春, 欧超, 史俊林, 汪多平, 李瑗. 2009. 新生期树鼩接种人乙型肝炎病毒的长期实验观察. 中华肝脏病杂志, **17**(8):580-584.]

Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Huang GH, Yang C. 1989. Human hepatitis B virus and aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma in tree shrew [J]. *Chn J Pathol*, **18**(1):19-22. [严瑞琪, 苏建家, 黄定瑞, 黄国华, 杨春. 1989. 人乙型肝炎病毒和黄曲霉毒素 B1 诱发树鼩原发性肝癌的研究. 中华病理学杂志, **18**(1):19-22.]

Zhao P, Dai M, Chen W, Li N. 2010. Cancer trends in China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, **40**(4):281-285.

Zhou YH, Wu C, Zhuang H. 2009. Vaccination against hepatitis B: the Chinese experience [J]. *Chn Med J:Engl*, **122**(1):98-102.

Zhuang H. 2009. Strengthen the prevention and treatment of hepatitis B [J]. *J Peking Univ :Health Sci*, **41**(3):259-562. [庄辉. 2009. 加强乙型肝炎防治. 北京大学学报: 医学版, 2009, **41**(3):259-562.]

动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 109−114
Zoological Research

CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01109

BACK

中国树鼩实验动物化研究进展和展望

沈培清[1,2,*]，郑 红[1,2,*]，刘汝文[1]，陈丽玲[1]，李 波[1]，何保丽[1]，李进涛[1]，
贲昆龙[1,3,4]，曹筱梅[1,3,4]，角建林[1,*]

(1. 昆明医学院，云南 昆明 650031；2. 云南省实验动物管理办公室，云南 昆明 650031；
3. 昆明康涛生物技术有限公司，云南 昆明 650106；4. 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223)

摘要：该文回顾了我国树鼩驯养繁殖和研究的发展历史，介绍了树鼩实验动物化研究的最新进展，并结合我国目前的状况，提出了今后的工作建议：加强实验树鼩标准化（包括地方和国家标准)的研究、近交系动物的研制、达到商业化树鼩的基础分子与细胞生物学研究工具的研制、人类重大疾病树鼩动物模型研究和建设国家实验树鼩种源基地等。

关键词：实验树鼩；驯养管理；动物模型；展望
中图分类号：Q959.832; Q95-33 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0109-06

Progress and prospect in research on laboratory tree shrew in China

SHEN Pei-Qing[1,2,*], ZHENG Hong[1,2,*], LIU Ru-Wen[1], CHEN Li-Ling[1], LI Bo[1], HE Bao-Li[1], LI Jin-Tao[1], BEN Kun-Long[1,3,4], CAO Xiao-Mei[1,3,4], JIAO Jian-Lin[1,*]

(1. *Kunming Medical University*, *Kunming*, *Yunnan* 650031, *China*; 2. *Yunnan Provincial Office for Laboratory Animal Administration*, *Kunming*, *Yunnan* 650031, *China*; 3. *Kunming Kangtao Biotechnology Company Ltd*, *Kunming*, *Yunnan* 650106, *China*; 4. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract: We outline the historical research on the laboratory tree shrew in China and discuss its current research trends. Five key aspects of applied research are emphasized in this review, including quality control standards for laboratory tree shrews, the establishment of an inbred colony, commercial preparation of major molecular and cellular research tools, further research on tree shrew models for human diseases, and the establishment of the tree shrew seed institution at state level.

Key words: Laboratory tree shrew; Breeding and management; Animal model; Prospect

树鼩(tree shrew, *Tupaia belangeri*)，又称北方树鼩(northern tree shrew)，是外形酷似松鼠的小型哺乳动物，在分类上属哺乳纲攀鼩目(Scandentia)。它主要分布在印度北部、缅甸、越南、泰国、柬埔寨、老挝、马来西亚、印尼、菲律宾等东南亚热带和亚热带国家和地区，我国主要分布在云南、贵州、广西、广东、海南等省区。根据地域差异，又可把我国的树鼩细分为以下 6 个亚种。滇西亚种(*T. b. chinensis*)，也就是我们目前所广泛研究的种类，分布于云南西部、中部和南部以及四川西南部。其他还有高黎贡山亚种(*T. b. gaoligongensis*)、海南亚种(*T. b. modesta*)，越北亚种(广西西南部)(*T. b. toninia*)、滇南亚种(*T. b. yunalis*)和瑶山亚种(广西西北部)(*T. b. yaoshanensis*) (Pen et al 1991) 。云南是我国树鼩资源最丰富的地区，也是树鼩应用研究最发达的地区。

收稿日期：2010-12-01；接受日期：2011-01-14
基金项目：云南省科技基础条件平台建设计划项目(2006pt07-1)；国家科技支撑计划项目(2009BA183B02-22)
*通讯作者(Corresponding authors), E-mail:yunnanlaa@yahoo.com.cn; zh1995097@yahoo.com.cn
第一作者简介：沈培清，研究员，研究方向为实验动物标准化

由于树鼩的许多分子和细胞结构近似于人类, 对多种人类重要病毒易感, 可作为重要人类病毒的动物模型, 并在肿瘤学、内分泌学、神经生物学、生殖生物学、免疫学等方面已有广泛和深入的研究。国内外已经有多篇文献综述(Wang et al, 2010; Shen et al, 2008; Xu et al, 2005; Fuchs & Corbach-Sohle, 2010)。树鼩的实验动物化是各项研究不可缺少的基础条件。全球在这一方面做得最好的是德国灵长类中心(Fuchs & Corbach-Sohle, 2010)。近年来, 在各级政府的支持下, 我国在树鼩的驯养繁殖、开发应用和实验动物标准化研究方面也取得了长足进展。

1 树鼩人工驯养繁殖研究的历史与现状

云南是全国开展树鼩人工驯养繁殖研究最早的省份。20 世纪 70 年代末, 昆明地区就开始人工驯养繁殖树鼩。中国科学院昆明动物研究所是我国开展树鼩人工驯养繁殖最早的单位, 该所围绕树鼩人工驯养繁殖和疾病防治开展了一系列相关研究, 包括分类学和生态学、寄生虫学、病理学、解剖学、神经生物学、遗传学、生物化学和免疫学, 为国内开展树鼩相关研究提供了宝贵的基本生物学资料。中国医学科学院医学生物学研究所在开展树鼩人工驯养繁殖和疾病防治研究的同时, 开展了树鼩实验感染疱疹病毒、轮状病毒(Wu et al, 1983;Wan et al, 1982)等方面的研究并获得成功。此外, 昆明医学院等单位也都开始了小规模树鼩人工驯养繁殖、疾病防治等相关领域的研究。

随着树鼩在人类疾病模型方面的应用潜力被逐步认识, 围绕树鼩作为实验动物模型的开发应用, 全国各地一些科研院所相继开展了树鼩驯养繁殖和应用的研究, 如武汉同济医科大学、上海市肿瘤研究所、广西壮族自治区肿瘤防治研究所、广西医科大学、广西大学、广州中医药大学、甘肃省医学科学研究院等(Wu et al, 1982; Zou et al, 1987; Zhou et al, 1987; Yu & Lian, 2001; Yu et al, 2002; Liang et al, 2005)。但这些单位均是因某一项科研课题的需要而进行的极小规模的探索性驯养繁殖, 是在完成科研项目的同时, 摸索树鼩人工繁殖的经验。广西是较多开展树鼩人工驯养繁殖研究的省份。在 20 世纪 70 年代末到 90 年代期间, 市场上流通的基本上都是野生实验用树鼩, 因为当时人工繁殖的子代树鼩很少, 还没有一个单位能够在实验室规模化地繁殖出子代树鼩并供应市场。由于树鼩实验动物化研究的长期滞后, 在不同程度上影响了树鼩开发应用研究的进程。

直至 21 世纪, 在广大科技工作者和政府的共同努力下, 我国树鼩人工繁育和标准化研究取得了显著进展。2006 年, 昆明医学院等单位承担了云南省科技厅基础平台项目——树鼩人工驯养繁殖和实验动物标准化研究, 研制出适宜树鼩繁殖和实验用的、具有自主知识产权的笼具(ZL 2009 2 0111624.5 & ZL2009 2 0111625.X)。突破了树鼩规模化人工驯养繁殖的技术难关, 打破繁殖的季节限制, 实现全年批量规模化繁殖。目前昆明医学院的树鼩种群有 600 多只, 其中繁殖用雌性树鼩 280 只(亲代雌鼩 180 只、仔一代 60 只和仔二代 40 只)。树鼩的年供应能力保持在 1 000 只以上。2009 年, 树鼩产仔数为 1330 只, 离乳数为 1205 只, 占 90.6%。由于技术上不断改进, 按照实验动物的要求, 昆明医学院建立了一系列操作规程和质量控制措施, 三年来, 树鼩产仔数和离乳率逐年提高。2007—2009 年间, 树鼩繁殖情况如表 1 所列。到 2009 年下半年, 平均树鼩窝仔数为 3.7 只, 初生均重 11.2 g, 离乳均重 91.6 g (表 2, 图 1)。至今, 昆明医学院已向全国各地批量供应有质量控制的实验室繁殖树鼩, 有效提升了实验树鼩的质量, 为树鼩在生物医学等领域的深入研究和广泛应用提供了基础保障。

此外, 广西医科大学在树鼩人工驯养繁殖研究方面也取得了一定成绩, 新生树鼩经被动母乳结合人工配方乳喂养的成活率达 92.2%, 非繁殖期使用激素类药物能提高成年树鼩的受孕率, 用药有效率达 61.5% (Liang et al, 2005)。中国科学院昆明动物研究所是我国最早开展树鼩驯养繁殖的单位(Peng

表 1 2007—2009 年间昆明医学院实验树鼩出生和存活情况*

Tab. 1 The birth and weaning of tree shrew at Kunming Medical University（KMU）during 2007 – 2009

年份 Year	产仔数(只) Birth number	离乳数(只) Weaning number	离乳率(%) Weaning rate
2007	282	7	2.5
2008	534	263	49.3
2009	1330	1205	90.6

*引自云南省科技厅科技基础条件平台建设计划《树鼩人工驯养繁殖和实验动物标准研究》2006PT07-1 项目结题报告 (The data are from Report of Yunnan Provincial Science and Technology Department project 2006PT07-1 “Tree Shrew Domestication and Laboratory Standardization”) 。

表 2　2008 年 3 月—2009 年 12 月昆明医学院树鼩繁殖情况

Tab. 2　The breeding data of adult tree shrew at KMU during March 2008 − December 2009

月份 Month	月均受孕次数 (次/月) Pregnancies per month	月均产仔窝数 (窝) Mean of delivery number per month	产仔率 (%) Birth rate	月均产子总数 (只/月) Mean of birth number per month	月均离乳总数 (只/月) Mean of weanling number per month	平均窝仔数(只) Mean of birth number per delivery	初生均重(g) Mean of neonate body weight	离乳均重(g) Mean of body weight at weanling
2008 年 3—12 月 Mar–Dec(n=206)	18.6	16.7	89.78	53.4	26.3	3.2	9.4±1.7	68.1±13.5
2009 年 1—6 月 Jan–Jun(n=150)	24.60	22.8	92.56	80.1	69.2	3.6	10.9±1.2	87.5±12.5
2009 年 7—12 月 Jul–Dec(n=150)	39.5	39.5	100.00	144.9	131.7	3.7	11.2±1.3	91.6±7.5

*引自云南省科技厅科技基础条件平台建设计划 2006PT07-1 项目结题报告(The data are from Report of Yunnan Provincial Science and Technology Department project 2006PT07-1 “Tree Shrew Domestication and Laboratory Standardization”）。



图 1　昆明医学院培育的子代树鼩

Fig. 1　Filial generation of tree shrews at Kunming Medical University

A、B：新生树鼩; C：出生 7 日龄树鼩; D：出生 10 日龄树鼩。引自云南省科技厅科技基础条件平台建设计划 2006PT07-1 项目结题报告。

A, B: New born babies of tree shrews; C: 7 days old tree shrews; D: 10 days old tree shrews. The data are from Report of Yunnan Provincial Science and Technology Department project 2006PT07-1 “Tree Shrew Domestication and Laboratory Standardization”.

et al, 1991), 2009 年, Li et al (2009)又开展了树鼩人工繁殖新方法的研究并获得成功。中国医学科学院医学生物学研究所在开展 HCV-cc 模型研究的同时, 也开展了树鼩人工繁殖研究并获得成功(Dai et al, 2008，2009)。与相关单位相比, 昆明医学院获得树鼩规模化繁殖的经验在于：改变以往稀粥样饲料, 用全价颗粒饲料喂养树鼩, 取消其他一切食品, 既保障营养均衡稳定, 又能有效控制饲料卫生质量和消化道疾病, 符合实验动物饲料生产许可证管理要求; 产仔巢穴近似野生树鼩巢穴(图 1), 产仔率和成活率有保障; 一雄多雌分居饲养定期批量合笼交配繁殖; 初产子代母树鼩由具有经产史的母树鼩诱导哺乳, 有效提高了子代树鼩的繁殖率和存活率; 繁殖工作由专人负责, 饲养员仅起到配合作用(专利申请号：201010 273008.7、201010273025.0 和 201010274335.4, Kunming Medical University）。

2 实验树鼩标准化的研究

实验树鼩标准化研究滞后，是长期以来实验树鼩应用研究发展缓慢的主要原因之一。迄今为止，实验树鼩尚无国家、行业质量控制标准。在兄弟单位同行们的大力支持下，在云南省专项经费的资助下，昆明医学院经过多年的努力工作，终于在 2010 年 10 月完成了“实验树鼩云南省地方标准”的研究和编制工作。云南省地方标准《实验树鼩(DB53/T 328.1-328.5—2010)》已于 2010 年 11 月 16 日正式发布，2011 年 3 月 1 日正式实施，其内容共分为 5 个部分：1. 实验树鼩（第 1 部分）：微生物学等级及检测(DB53/T 328.1); 2. 实验树鼩（第 2 部分）：寄生虫学等级及检测(DB53/T 328.2); 3. 实验树鼩（第 3 部分）：遗传学质量控制(DB53/T 328.3); 4. 实验树鼩（第 4 部分）：配合饲料(DB53/T 328.4); 5. 实验树鼩（第 5 部分）：环境及设施(DB53/T 328.5)。本标准的颁布填补了我国实验树鼩无质量标准的空白，为树鼩人工繁殖和实验研究提供了全面的质量保障，结束了长期仅能使用野生树鼩的历史，标志着树鼩实验动物化研究取得了突破性进展，为实验树鼩广泛应用和深入研究奠定了质量保障。当然，该标准还有一些条款需要在今后的实际工作中予以补充、完善和提高。

目前，国家科技部已经重视我国资源动物的实验动物化工作。2010 年，科技部启动了国家科技支撑项目：人畜共患病感染动物模型技术研究及我国特有野生动物实验动物化，其中涉及 3 个资源动物：树鼩、长爪沙鼠、灰仓鼠。其子课题：普通级树鼩种群和 HCV 感染模型的建立与评价，由中国医学科学院医学生物学研究所和昆明医学院共同承担。这表明我省在树鼩实验动物化研究与实践方面走在全国前列。

3 我国实验树鼩开发应用研究的建议

在“十二五”期间，国家将建立实验动物种质资源管理体系，建立和完善实验动物种质资源中心和保存基地。同时，继续关注人类重大疾病动物模型和实验动物资源的标准化及评价体系的研究。科技部将进一步启动国家科技支撑计划项目：“重大疾病动物模型和实验动物资源的标准化及评价体系的建立”，通过该项目的实施，促进我国实验动物标准化进程，为我国科技自主创新、重大疫病防控和人类健康提供有力支撑。所以，我们应密切关注国家在资源动物标准化建设方面的发展动向，抓住机遇，进一步完善树鼩标准化研究，开展树鼩人类重大疾病动物模型研究。对此，提出一些建议。

3.1 开展实验树鼩质量控制国家标准的研究

目前由云南省质量技术监督局颁布的《实验树鼩 云南省地方标准》——《实验树鼩(DB53/T 328.1-328.5—2010)》，仅仅是推荐性地方标准。由于受人力、财力等条件的制约，该标准的条款内容还有许多不够全面的地方，需要在实践中做进一步的补充完善和提高；有些条款需要做验证实验，以保证其各项条款内容的科学性、可靠性和权威性。为此，建议省实验动物工作管理机构组织全省相关单位的专业技术人员，在《实验树鼩 云南省地方标准》的基础上，开展实验树鼩质量控制国家标准的研究，共同参与和完成修订完善提升工作，加快树鼩实验动物标准化研究进程，尽早把《实验树鼩 云南省地方标准》提升为国家标准，引领我国实验树鼩标准化研究工作，促进我省实验树鼩研究开发工作的进程，吸引更多省外乃至国外的研究项目落户云南。

3.2 近交系实验树鼩的培育研究

近交系实验动物的出现，曾经大大推动了许多十分重要的生物学研究的突破。相对于灵长类动物而言，树鼩的生命周期较短，多胎生殖，从理论上看，比较容易培育近交系动物。我们应该探索实验树鼩的近交系动物的培育。如果可能的话，还可以如同培育小鼠那样，按照我们人类的科学研究任务的需要，培育具有不同生物学特性的近交系。

3.3 进一步加强实验树鼩的基础生物学研究

与小鼠等已有实验动物相比较，人们对于树鼩的基础生物学的研究非常有限，这已经成为树鼩在生物医学研究方面应用的瓶颈。我们建议要尽快加强树鼩基础分子生物学和细胞生物学的研究，研制出一些常用的研究工具，如分子探针和单克隆抗体等，组织国内有关力量，尽早进行树鼩的基因组测序以及比较基因组和比较蛋白质组的研究。可喜的是国内已经有一些研究团队正在这方面开展深入研究并取得较好结果(Li et al, 2010; Zhang D et al, 2009, Zhang P et al, 2009; Shao et al, 2009)。

3.4 开展人类重大疾病的树鼩动物模型的研究

目前，HCV 是危害人类身体健康和生命安全的重大传染病之一，全球已超过 1.7 亿感染人群，每

年新增 300 万感染者，每年因肝细胞癌死亡人数达 100 万。云南是 HIV 感染重灾区，HIV 感染者也是 HCV 的易感人群，云南自然成为 HCV 的重灾区。因此，在云南开展树鼩 HCV 等疾病动物模型的研究和应用，具有十分重要的现实意义和深远的历史意义。目前昆明地区有 6 个以上的单位同时在开展 HCV 的相关研究 (Xu et al, 2007)。建议国家和省政府科技管理部门进行组织，既有分工，又有合作，避免不必要的重复。以 HCV 疾病动物模型的研究和开发应用为突破口，全方位深入开展树鼩 HCV 动物模型的研究，为应用于防治 HCV 的疫苗和有效药物研究的动物模型的建立，奠定基础。

此外，树鼩还可以作为许多研究的动物模型，如人乙型病毒性肝炎和人疱疹病毒的研究、行为和社会结构研究、人类抑郁症的药物研究，以及人类老年病的研究等等，因此，完全有必要把实验树鼩建成继实验猕猴之后又一个实验动物支柱品种，促进我省实验动物科技产业的可持续发展，把昆明地区在树鼩实验研究方面的技术和资源优势保持和发展下去。这样，既发挥了我省实验动物资源的优势，也为国家的实验动物科技事业做出应有的贡献。

3.5 建立国家级实验树鼩种源基地、生产供应基地和动物实验研究基地

云南不仅是著名的动物王国，更是我国实验动物工作的发源地，曾经有过实验动物科技事业的辉煌历史，昆明鼠、猕猴、版纳微型猪等实验动物为我国的实验动物科技事业做出了积极贡献。改革开放以来，云南的科技工作和科研实力得到了大幅度提升，实验动物科研和综合开发能力处在全国前列。树鼩是我省又一个资源十分丰富的实验动物种类，全国 6 个亚种，云南，占有 3 种，且是全省性分布，占有天时地利人和的优势。

昆明是我国开展树鼩人工驯养繁殖和研究时间最早、基础条件最好、技术人才队伍最强的地区。在树鼩规模化人工驯养繁殖技术、质量控制标准研究以及 HCV 模型研究等方面均处全国领先水平，树鼩实际上已经成为继昆明鼠、猕猴、版纳微型猪之后我省又一个实验动物支柱品种。建议省政府科技主管部门组织全省人力物力和财力，发挥云南树鼩资源优势和人才技术优势，在争取国家实验动物专项基金的同时，设立项目专项资金，把昆明建成国家级实验树鼩种源基地、生产供应基地和动物实验研究基地，在为我省实验树鼩的研发应用打下坚实基础的同时，也为树鼩的产业化发展和全国的生产供应做出我们应有的贡献。

参考文献：

Dai JJ, Fong JH, Ye YS, Sun XM, Xu CX, Gao JH, Kuang DX, Huan YY, Luo ZW, Tang DH. 2008. Patent cage for domesticating and breeding and test of tree shrew. China, CN200820199835.4 [P]. [代解杰, 冯建洪, 叶尤松, 孙晓梅, 许长兴, 高家红, 匡德宣, 罕园园, 罗志武, 唐东红. 2008. 人工饲养繁殖及实验用树鼩专用笼具. 中国, CN200820199835.4].

Dai JJ, Sun XM, Jiang QF, Kuang DX, Huan YY, Ye YS, Huang ZQ, Lu CX, Tang DH. 2009. Laboratory breeding method for research on laboratory animal of tree shrew. China, CN200910095042.7[P]. [代解杰, 孙晓梅, 江琴芳, 匡德宣, 罕园园, 叶尤松, 黄璋琼, 陆采霞, 唐东红. 2009.野生树鼩实验动物化中的人工繁殖法. 中国，CN200910095042.7]

Fuchs E, Corbach-Sohle S. 2010. Tree shrew[M]// Hubrecht R, Kirkwood J. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. 8th ed New York: Wiley-Blackwell. 20

Kunming Medical University. 2010. Laboratory breeding method for cage bred tree shrew. China, patent application No.201010273025.0 [P]. [昆明医学院. 2010. 一种实验室条件下子代树鼩繁殖的方法. 中国, 专利申请受理通知书. 申请号 201010273025.0]

Kunming Medical University. 2010. Laboratory breeding method in large scale mating of tree shrew. China, patent application No. 201010273008.7 [P]. [昆明医学院. 2010. 一种树鼩规模化交配的繁殖方法. 中国, 专利申请受理通知书. 申请号：201010273008.7]

Kunming Medical University. 2010. Tree shrew formula feeds and producing method. China. patent application No. 201010274335.4[P]. [昆明医学院. 2010. 一种树鼩全价颗粒饲料及其制备方法.中国专利申请受理通知书. 申请号：201010274335.4]

Li G, Yan Y, Chang YY, Lu LB. 2009.New method of tree shrew breeding in laboratory〔J〕. *Mod Anim Husban Vet*, **3**: 18-21. [李贵, 严晔, 常云艳, 吕龙宝. 2009. 树鼩实验室繁殖的新方法. 现代畜牧兽医, **3**：18-21.]

Liang l, Li Y, Yang C, Su JJ, Duan XX, Cao J, Ou C,Ban KC, Yue HF.2005. Breeding of tree shrews in laboratory [J]. *Sichuan J Zool,* 24(2)：199-20l. [梁亮, 李媛, 杨春, 苏建家, 段小娴, 曹骥, 欧超, 班克臣, 岳惠芬. 2005. 树鼩实验室繁殖及育幼的探讨. 四川动物, **24**(2)：199-20l.]

Li YJ, Gao YD, Guo Y, Lu CX, Huang JF, Xia XS, Dai JJ, Fan QS, Li ZS, Zhang HT. 2010. Cloning of full-length sequence of tree shrew CD3 ε and prediction of its molecular characteristics[J]. *Zool Res,* **31**(5): 483-489. [李乙江, 高跃东, 郭彦, 陆彩霞, 黄京飞, 夏雪山, 代解杰, 范泉水, 李作生, 张华堂. 2010. 树鼩 CD3ε 全长编码序列的克隆及分子特征分析. 动物学研究, **31**(5): 483-489.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese Tree Shrew[M]. Kunming: Yunnan Scince and

Technology Press. [彭燕章, 叶智彰, 邹如金, 王应祥, 田保平, 马原野, 施立明. 1991 树鼩生物学. 昆明：云南科技出版社.]

Shao XL, Zhang XD, Zhang YX, Zhang HT, He YW. 2009. Isolation, identification and expression analysis of interleukin 2 receptor α chain(CD25) gene in *Tupaia belangeri*[J]. *J Univ Sci Technol Chn*， **39**: 714-721.

Shen PQ, Liu MF, Liu RW, Jiao JL.2008, Study on application、standards and industrialization of tree shrew〔J〕. *Lab Anim* Sci **25**(1): 49-52.[沈培清, 刘美芳, 刘汝文, 角建林. 2008. 树鼩的应用和标准化产业化研究. 实验动物科学, **25**(1): 49-52.]

Wan XB, Liu JC, Xu AY 1982. Experimental infection of adult tree shrew with rotavirus[J]. *Chn J Med*. **62**: 461-465. [万新邦, 刘玑昌, 胥爱源. 1982. 用人轮状病毒感染成年树鼩的实验研究. 中华医学杂志, **62**：461-465.]

Wang XJ, Yang C, Su JJ. 2010. Development of application of tree shrew in experimental medical research〔J〕. *Chn J Comp Med* , **20**(2): 67-70[王晓娟, 杨春, 苏建家. 2010. 树鼩在医学实验研究中的新进展. 中国比较医学杂志, **20**(2): 67-70.]

Wu XX, Liu MY, Dai CB, Zhu BY, Dai ZX. 1982. Laboratory breeding and reproduction in tree shrew [J]. *Chin J Zool,* **17**(2): 38-40. [吴晓娴, 刘名英, 代长柏, 朱保友, 代忠祥. 1982. 树鼩的实验室饲养和繁殖. 动物学杂志, **17**(2): 38-40.]

Wu XX, Tang EH, Xie GZ 1983, Research on tree shrew with herpesvirus I: the isolation，biological characteristics and serum of the virus [J]. *Chn J Microbiol Immunol*, **3**: 33-36. [吴小娴, 唐恩华, 谢光诊. 1983. 树鼩疱疹病毒的研究 I：病毒的分离、生物学性状和血清学研究. 中华微生物学和免疫学杂志, **3**：33-36.]

Xu XP, Cheng HB, Ben KL.2005. Application of tree shrew as an animal model in biomedical research. [J] *Acta Lab Anim Sci Sin* **13**(3): 49-52[徐新平, 陈红波, 贲昆龙. 2005. 树鼩在医学生物学中的应用. 中国实验动物学报, **13**(3): 187-90.]

Xu X ,Chen H, Cao XM, Ben KL.2007. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangery*) with hapetitis C virus grown in cell culture or from patient plasma [J]. *J Gen Virol*, **88**: 2504-2512.

Yu FR, Lian XR. 2001. Effects of the artificial environment on hemogram and myelogram of Chinese tree shrews[J]. *J Gansu Sci*, **13**(2): 51-53. [俞发荣, 连秀珍. 2001. 人工环境对树鼩血象和骨髓象的影响. 甘肃科学学报, **13**(2): 51-53.]

Yu YM, Wu YQ, Wang SC. Luo HT. Yao M, Qian GS, Chang H. 2002. Laboratory domestication of *Tupaia blangeri chinensis*[J]. *J Shanghai Jiaotong Univ*: *Agri Sci*, **22**(1): 24-27. [于永梅, 吴一迁, 王生存, 罗海涛. 姚明, 钱耕荪, 常洪. 2002. 中缅树鼩的实验室驯化. 上海交通大学学报: 农业科学版, **22**(1): 24-27.]

Zhang D, Gao L, Zhang YX, Sun L, Feng Y, He YW, Xia XS, Zhang HT. 2009. Crucial factors for *de novo* establishment of long-term primary culture of tree shrew hepatocytes [J]. *Zool Res,* **30**(1): 24-30 [张顼, 高丽, 张远旭, 孙丽, 冯悦, 何有文, 夏雪山, 张华堂. 2009. 树鼩肝细胞体外分离培养体系的复建及主要影响因素分析. 动物学研究, **30**(1): 24-30.]

Zhang P, Li D, Stewart-Jones G, Shao X, Chen Q, Li Y, He YW, Xu XN, Zhang HT. 2009. A single amino acid defines cross-species reactivity of tree shrew(*Tupaia belangeri*) CD 1d to human invariant natural killer t(iNKT) cells [J]. *Immunology*, **128**(4): 500-10.

Zou RJ, Ji WZ, Sha LC, Lu JM, Yan Y, Yang KQ. 1987. Reproduction in tree shrew(*Tupaia blangeri chinensis* [J].*Zool Res*, **8**(3): 231-238. [邹如金, 季维智, 沙临力, 陆锦明, 严晔, 杨克勤. 1987. 树鼩的繁殖. 动物学研究, **8**(3): 231-238.]

Zhou SC, Cai HL, Zhou M, Yan HL, Zhang XZ. 1987. The biological characters observation of *Tupaia blangeri chinensis* in laboratory domestication [J] .*Shanghai Lab Anim Sci,* **13**(1): 33, 47. [周顺长, 蔡红琳, 周明, 严海兰, 章贤忠. 1987. 人工饲养条件下树鼩的生物学特性观察. 上海实验动物科学, **13**(1): 33, 47.]


DONGWUXUE YANJIU

双月刊(双月22日出版)，1980年创刊
Bimonthly, started in 1980
第32卷第1期，Vol.32 No.1

ZOOLOGICAL RESEARCH

编　　辑　《动物学研究》编辑委员会
[650223　昆明市教场东路32号　中国科学院昆明动物研究所　电话：(0871)5199026　传真：(0871)5191823　zoores@mail.kiz.ac.cn]
主　　编　张亚平
主办单位　中国科学院昆明动物研究所　中国动物学会®
主管单位　中国科学院
出版单位　科学出版社（北京东黄城根北街16号　邮编100717）
印刷装订　昆明小松制版印刷有限公司(昆明市北京路402号建设大厦15楼　邮编650031)
国内总发行　云南省邮政公司报刊发行局（昆明市吴井路139号　邮编650011）
订 购 处　全国各地邮政局
国外总发行　中国国际图书贸易总公司（中国国际书店）(北京399信箱　邮编100044)
广告经营许可证：滇工商广字66号

Edited by Editorial Board of Zoological Research
(Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, 32 Jiaochang Donglu, Kunming, Yunnan, Post Code: 650223　Tel: +86 871 5199026　Fax: +86 871 5191823
E-mail: zoores@mail.kiz.ac.cn　Website: http://www.zoores.ac.cn)
Editor-in-Chief: ZHANG Ya-Ping
Sponsored by Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences; China Zoological Society®
Published by Science Press (16 Donghuangchenggen Beijie, Beijing 100717, China)
Printed by Kunming Xiaosong Plate Making & Printing Co. Ltd
Distributed by Yunnan Post
Domestic: All Local Post Offices in China
Foreign: China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian) P.O.BOX 399, Beijing 100044, China

国内外公开发行　刊号：ISSN 0254-5853 / CN 53-1040/Q

国内邮发代号：64－20　国外发行代号：BM358
定价：¥25.00　Post No：BM358

动物学研究（DONGWUXUE YANJIU）

第 32 卷第 1 期　　　2011 年 2 月

《灵长类动物与人类疾病模型》专刊目次

Guest Editors: 徐　林，郑永唐

[期刊基本参数] CN53－1040/Q * 1980 * b * A4 * 114* zh + en * P * ￥25.00 * 900 * 17 * 2011-2　http://www.zoores.ac.cn